

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-278203

(43)Date of publication of application : 24.10.1995

(51)Int.Cl. C08B 37/00
A61L 27/00

(21)Application number : 06-271556

(71)Applicant : COLLAGN CORP

(22)Date of filing : 04.11.1994

(72)Inventor : RHEE WOONZA M
BERG RICHARD A

(30)Priority

Priority number : 93 146843 Priority date : 03.11.1993 Priority country : US

(54) GLYCOSAMINOGLYCAN-SYNTHETIC POLYMER CONJUGATE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a conjugate biocompatible, biologically inert, highly stable in vivo and useful for augmentation of soft or hard tissues and so on by employing a conjugate comprising a specific compound, or a derivative thereof, chemically bonded to a hydrophilic synthetic polymer.

CONSTITUTION: A conjugate comprising a glycosaminoglycan or a derivative thereof is employed, where the glycosaminoglycan, preferably selected from the group consisting of hyaluronic acid, chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, dermatan sulfate, heparin, keratan sulfate, kerato sulfate, chitin, chitosan 1, chitosan 2 and a derivative thereof, is chemically conjugated to a hydrophilic synthetic polymer, preferably a multifunctionally activated polyethylene glycol.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-278203

(43) 公開日 平成7年(1995)10月24日

(51) IntCl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 B 37/00	G	7433-4C		
A 6 1 L 27/00	W			

審査請求 未請求 請求項の数50 O L (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願平6-271556	(71) 出願人	591223079 コラーゲン・コーポレイション COLLAGEN CORPORATION アメリカ合衆国カリフォルニア州94303、 パロ・アルト、フェイパー・ブレイス2500 番
(22) 出願日	平成6年(1994)11月4日	(72) 発明者	ウーンザ エム. リー アメリカ合衆国 カリフォルニア 94306、 パロ アルト、ラドンナ アベニュー 3845
(31) 優先権主張番号	0 8 / 1 4 6 , 8 4 3	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	1993年11月3日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体

(57) 【要約】

【目的】 広い範囲の治療用用途（特に、軟組織の増強、硬組織の増強、移植片の被覆など）において有用な、結合体およびこの結合体を含有する組成物を提供すること。

【構成】 親水性合成ポリマーと化学的に結合したグリコサミノグリカンまたはその誘導体を包含する、生体適合性の生物学的に不活性な結合体、およびこの結合体を含有する組成物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 親水性合成ポリマーと化学的に結合したグリコサミノグリカンまたはその誘導体を包含する、生体適合性の生物学的に不活性な結合体。

【請求項2】 前記グリコサミノグリカンが、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、デルマトン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸、ケラト硫酸、キチン、キトサン1、キトサン2、およびそれらの誘導体からなる群から選択される、請求項1に記載の結合体。

【請求項3】 前記グリコサミノグリカンが、脱アセチル化または脱硫酸化により誘導体化される、請求項1に記載の結合体。

【請求項4】 前記親水性合成ポリマーが、多官能性活性化ポリエチレングリコールである、請求項1に記載の結合体。

【請求項5】 前記親水性合成ポリマーが、二官能性活性化ポリエチレングリコールである、請求項4に記載の結合体。

【請求項6】 以下の一般構造式を有する、請求項1に記載の結合体：



ここで、nは0から4までの範囲の整数であり、GAGはグリコサミノグリカンまたはその誘導体であり、そして、Zは0または0-C=0である。

【請求項7】 以下の一般構造式を有する、請求項1に記載の結合体：



ここで、nは0から4までの範囲の整数であり、GAGは1種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体であり、GAG'は異なる種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体であり、そして、Zは0または0-C=0である。

【請求項8】 前記GAGおよびGAG'が、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、デルマトン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸、ケラト硫酸、キチン、キトサン1、キトサン2、およびそれらの誘導体からなる群から選択される、請求項7に記載の結合体。

【請求項9】 約5%から約95%までの範囲の水分含量を有するヒドロゲル組成物の形態をしている、請求項1に記載の結合体。

【請求項10】 親水性合成ポリマーと化学的に結合したグリコサミノグリカンまたはその誘導体を含む結合体、および、治療に有効な量のサイトカインまたは増殖因子を含有する組成物。

【請求項11】 前記グリコサミノグリカンが、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、デルマトン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸、ケラト硫酸、キチン、キトサン1、キトサン2、およびそれらの誘導体、ならびに、これらのグリコサミノグリカンまたはそれらの誘導体の混合物からなる群から選択され

る、請求項10に記載の組成物。

【請求項12】 前記サイトカインまたは増殖因子が、上皮増殖因子、形質転換増殖因子 α 、形質転換増殖因子 β 、形質転換増殖因子 β 2、血小板由来増殖因子AA、血小板由来増殖因子AB、血小板由来増殖因子BB、酸性線維芽細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、結合組織活性化ペプチド、 β トロポグロブリン、インシュリン様増殖因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン、コロニー刺激因子、エリスロポエチン、神経成長因子、インターフェロン、骨形態形成タンパク質、および骨形成因子からなる群から選択される、請求項10に記載の組成物。

【請求項13】 前記増殖因子が、形質転換増殖因子 β 、形質転換増殖因子 β 1、形質転換増殖因子 β 2、およびエリスロポエチンからなる群から選択される、請求項12に記載の組成物。

【請求項14】 注入可能で薬学的に受容可能な組成物であって、親水性合成ポリマーと化学的に結合したグリコサミノグリカンまたはその誘導体を含む結合体、および、該組成物を注入可能にするのに充分な量の薬学的に受容可能な流動性キャリアを含有する、組成物。

【請求項15】 前記グリコサミノグリカンが、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、デルマトン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸、ケラト硫酸、キチン、キトサン1、キトサン2、およびそれらの誘導体、ならびに、これらのグリコサミノグリカンまたはそれらの誘導体の混合物からなる群から選択される、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】 コラーゲンまたはその誘導体と化学的に結合し、グリコサミノグリカンまたはその誘導体とも化学的に結合している、二官能性活性化親水性合成ポリマーを包む、生体適合性の生物学的に不活性な結合体。

【請求項17】 以下の一般構造式を有する、請求項16に記載の結合体：



ここで、nは0から4までの範囲の整数であり、そして、GAGはグリコサミノグリカンまたはその誘導体であり、COLはコラーゲンまたはその誘導体であり、そして、Zは0または0-C=0である。

【請求項18】 前記GAGが、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸類、ヘパリン、ケラタン硫酸、ケラト硫酸、キチン、キトサン1、キトサン2、およびそれらの誘導体、ならびに、これらのグリコサミノグリカンまたはそれらの誘導体の混合物からなる群から選択される、請求項17に記載の結合体。

【請求項19】 前記コラーゲンが、繊維性コラーゲンまたは非繊維性コラーゲンからなる群から選択される、請求項17に記載の結合体。

【請求項20】 膜、ビーズ、スポンジ、チューブ、シート、および形成移植片からなる群から選択される形態

をしている、請求項17に記載の結合体。

【請求項21】 約5%から約95%までの範囲の水分含量を有するヒドロゲル組成物の形態をしている、請求項17に記載の結合体。

【請求項22】 心臓弁、膝蓋骨、耳、鼻、および頬骨からなる群から選択される身体部分の修復、増強、または置換に使用するための形成移植片の形態をしている、請求項20に記載の結合体。

【請求項23】 関節液または硝子体液に対する体液置換体の形態をしている、請求項17に記載の結合体。

【請求項24】 移植片を被覆するのに適切な組成物であって、少なくとも1種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体と化学的に結合した二官能性活性化親水性合成ポリマーを含む結合体を含有する、組成物。

【請求項25】 前記結合体が、1種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体と化学的に結合し、そしてコラーゲンまたはその誘導体とも化学的にしている、二官能性活性化親水性合成ポリマーを含む、請求項24に記載の組成物。

【請求項26】 前記結合体が、2種の異なるグリコサミノグリカンまたはそれらの誘導体と化学的に結合した二官能性活性化親水性合成ポリマーを含む、請求項24に記載の組成物。

【請求項27】 前記結合体が、1種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体と化学的に結合した二官能性活性化親水性合成ポリマーを含む、請求項24に記載の組成物。

【請求項28】 前記グリコサミノグリカンが、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、デルマトン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸、ケラト硫酸、キチン、キトサン1、キトサン2、およびそれらの誘導体、ならびにこれらのグリコサミノグリカンまたはそれらの誘導体の混合物からなる群から選択される、請求項24に記載の組成物。

【請求項29】 前記コラーゲンが、繊維性コラーゲンおよび非繊維性コラーゲンからなる群から選択される、請求項25に記載の組成物。

【請求項30】 生体適合性の生物学的に不活性な結合体を含有する、哺乳類の硬組織の増強に適切な組成物であって、該結合体が、少なくとも1種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体と化学的に結合した二官能性活性化親水性合成ポリマーを含み、そして、実質的に全ての結合していない水を除去するために脱水されている、組成物。

【請求項31】 前記結合体が、1種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体と化学的に結合し、コラーゲンまたはその誘導体とも化学的に結合している、二官能性活性化親水性合成ポリマーを含む、請求項30に記載の組成物。

【請求項32】 前記結合体が、2種の異なるグリコサ

ミノグリカンまたはそれらの誘導体と化学的に結合した二官能性活性化親水性合成ポリマーを含む、請求項30に記載の組成物。

【請求項33】 前記結合体が、1種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体と化学的に結合した二官能性活性化親水性合成ポリマーを含む、請求項30に記載の組成物。

【請求項34】 前記グリコサミノグリカンが、エステル結合、エーテル結合、ウレタン結合、および $-(CH_2)_n-NH-$ 結合からなる群から選択される結合を介して、前記親水性合成ポリマーと共有結合している、請求項30に記載の組成物。

【請求項35】 前記グリコサミノグリカンが、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、デルマトン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸、ケラト硫酸、キチン、キトサン1、キトサン2、およびそれらの誘導体、ならびに、これらのグリコサミノグリカンまたはそれらの誘導体の混合物からなる群から選択される、請求項30に記載の組成物。

【請求項36】 前記コラーゲンが、繊維性コラーゲンまたは非繊維性コラーゲンからなる群から選択される、請求項31に記載の組成物。

【請求項37】 以下の工程を包含する、哺乳類への投与に適切なグリコサミノグリカン-ポリマー結合体を調製する方法：化学的に誘導体化したグリコサミノグリカンの水溶液を提供する工程；活性化合成ポリマーの溶液を添加して、反応混合物を形成する工程であって、該活性化合成ポリマーが、該化学的に誘導体化したグリコサミノグリカンの利用可能なアミノ基と共有結合を形成し得る反応基を有する親水性合成ポリマーを包含する工程；および該活性化合成ポリマーと該グリコサミノグリカンとの共有結合を形成する工程。

【請求項38】 以下の工程を包含する、哺乳類の軟組織を増強する方法：少なくとも1種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体と、二官能性活性化親水性合成ポリマーとを共に混合することにより、注入可能な組成物を調製する工程；および混合後直ちに、該組成物を増強が必要な軟組織部位へ注入し、注入後インサイチュで、該グリコサミノグリカンを含むポリマーとコラーゲンとの化学結合体が連続して形成される、工程。

【請求項39】 前記注入可能な組成物が、少なくとも1種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体を含有する、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 前記注入可能な組成物が、コラーゲンまたはその誘導体をさらに含有する、請求項39に記載の方法。

【請求項41】 前記注入可能な組成物が、2種のグリコサミノグリカンまたはそれらの誘導体を含有する、請求項38に記載の方法。

【請求項42】 前記グリコサミノグリカンが、ヒアル

ロン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、デルマトン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸、ケラト硫酸、キチン、キトサン1、キトサン2、およびそれらの誘導体、ならびにこれらのグリコサミノグリカンまたはそれらの誘導体の混合物からなる群から選択される、請求項38に記載の方法。

【請求項43】 前記コラーゲンが、繊維性コラーゲンおよび非繊維性コラーゲンからなる群から選択される、請求項40に記載の方法。

【請求項44】 生体適合性の生物学的に不活性な結合体を含有する組成物を、増強が必要な硬組織部位へ、注入または外科的移植によって付与する工程を包含する、哺乳類の硬組織を増強する方法であって、該結合体が、少なくとも1種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体と化学的に結合した二官能性活性化親水性合成ポリマーを含み、そして、実質的に全ての結合していない水を除去するために脱水されている、方法。

【請求項45】 注入可能な前記組成物が、1種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体を含有する、請求項44に記載の方法。

【請求項46】 注入可能な前記組成物が、コラーゲンまたはその誘導体をさらに含有する、請求項45に記載の方法。

【請求項47】 注入可能な前記組成物が、2種のグリコサミノグリカンまたはそれらの誘導体を含有する、請求項44に記載の方法。

【請求項48】 前記グリコサミノグリカンが、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、デルマトン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸、ケラト硫酸、キチン、キトサン1、キトサン2、およびそれらの誘導体、ならびに、これらのグリコサミノグリカンまたはそれらの誘導体の混合物からなる群から選択される、請求項44に記載の方法。

【請求項49】 前記コラーゲンが、繊維性コラーゲンまたは非繊維性コラーゲンからなる群から選択される、請求項46に記載の方法。

【請求項50】 前記硬組織部位が、骨および軟骨からなる群から選択される、請求項44に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、生体適合性の結合体に関し、そして特に、親水性合成ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール(PEG)）と結合した（必要に応じて、コラーゲンとも同様に結合する）、1種またはそれ以上のグリコサミノグリカンまたはそれらの誘導体を含有する、薬学的に受容可能な非免疫性組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 Danielsらは、米国特許第3,949,073号で、組織を酸性水溶液に溶解し、続いて酵素分解することにより可溶性コラーゲンを調製することを開示した。

得られたアテロペプチド(atelopeptide)コラーゲンは可溶性であり、そして、未修飾のコラーゲンよりも本質的に免疫原性が低い。これは、原繊維形成促進剤（上記特許では、重合促進剤として記載されている）と共に被験体の適切な位置へ注入されて、繊維コラーゲン移植片をインサイチュで形成し、硬組織または軟組織を増強し得る。この材料は、現在、Zyderm（登録商標）Collagen Implantという商標で、Collagen Corporation (Palo Alto, CA) から市販されている。

【0003】 Luckらは、米国特許第4,488,911号で、コラーゲン溶液(collagen in solution(CIS))の調製方法を開示した。この方法では、天然コラーゲンを酸性希釈水溶液中で動物組織から抽出し、続いて、酵素（例えば、ペプシン、トリプシン、またはPronase（登録商標）(American Hoechst Corporation, Somerville, N J)の商標)で分解している。酵素分解によりコラーゲン分子のテロペプチド部分が除去され、「アテロペプチド」コラーゲン溶液が提供される。このアテロペプチドCISは、本質的に非免疫原性であり、そしてまた、主要な架橋領域が損失しているために本質的に非架橋である。次いで、適度の剪断環境下で透析することにより、CISは沈澱し、天然コラーゲン繊維に類似したコラーゲン繊維が生成し得る。沈澱して再構築された繊維は、化学物質（例えば、ホルムアルデヒドおよびグルタルアルデヒドのようなアルデヒド類）、熱、または放射線を用いて、さらに架橋され得る。得られた生成物は、生体に適合しそして免疫原性が低いために、医療用移植片としての使用に適切である。

【0004】 Wallaceらは、米国特許第4,424,208号で、軟組織の増強における使用が適切な、改良したコラーゲン処方物を開示した。Wallaceの処方物は、再構築された繊維性アテロペプチドコラーゲン（例えば、Zyderm（登録商標）Collagen）を、水性媒体中に分散した架橋アテロペプチドコラーゲンの微粒子と組み合わせて含有している。架橋コラーゲン微粒子の添加により、移植片の存続性または移植後の収縮を妨げる能力が向上する。

【0005】 Smestadらは、米国特許第4,582,640号で、医療用移植片の使用に適切な、グルタルアルデヒドで架橋したアテロペプチドCISの調製（GAX）を開示した。このコラーゲンは、繊維間結合よりも繊維内結合が優先する条件下で架橋され、非架橋のアテロペプチドコラーゲンよりも優れた存続性の生成物を提供する。この生成物は、Zyplast（登録商標）Collagen Implantという商標で、Collagen Corporationから市販されている。

【0006】 Nguyenらは、米国特許第4,642,117号で、機械的剪断によるアテロペプチドCISの粘性を低下させる方法を開示した。再構築されたコラーゲン繊維は、粘性が注入のための実際レベルまで低下するまで、微細格子ふるいにかける。

【0007】Nathanらは、米国特許第4,563,350号で、骨誘導性因子、少なくとも5%の再構築されていない（無原繊維性）コラーゲン、および残りの再構築されたコラーゲン、ならびに／または、無機質粉末（例えば、ヒドロキシアパタイト）を含有する骨誘導性骨修復組成物を開示した。CISは、再構築されていないコラーゲンとして用いられ得、そしてZyderm（登録商標）Collagen Implant (ZCI)は、再構築されたコラーゲンの成分として好ましい。この材料は、破骨細胞の成長を促進するために、そして新しい骨の成長を促すために、骨の欠損部分または破損部分に移植される。

【0008】Chuらは、米国特許第4,557,764号で、所望の順応性およびパテ様の稠度を示す「第二の核形成」コラーゲン沈澱物を開示した。コラーゲンは溶液中に提供され（例えば、2〜4mg/mL）、そして「第一の核形成生成物」が迅速な滴定および遠心により沈澱する。次いで、残りの上澄み（元のコラーゲンのバルクを含有する）をデカンテーションし、一晚そのままにしておく。沈澱した第二の核形成生成物は、遠心分離により集められる。

【0009】Chuは、米国特許第4,689,399号で、コラーゲングルを圧縮および乾燥することにより調製される、コラーゲン膜の調製を開示した。得られた生成物は、良好な引張強さを有する。

【0010】Silverらは、米国特許第4,703,108号で、脱水素加熱手段またはシアナミドを用いることにより、不溶性架橋コラーゲンで調製されるスポンジの調製を開示した。Bergら、米国特許第4,837,285号は、軟組織を増強するためのビーズ形態でのコラーゲンの調製を開示した。Brodskyら、米国特許第4,971,954号は、リボースまたは他の還元糖を用いた架橋コラーゲンの方法を開示している。

【0011】Miyataらは、日本国特開平4-227265号（1992年8月17日公開）で、ポリエポキシ化合物と結合したアテロペプチドコラーゲンを含有する組成物を開示した。この組成物は、体内に注入され、持続した皮膚隆起効果をもたらす。

【0012】J.A.M. Ramshawらは、Anal Biochem (1984) 141:361〜65およびPCT出願 WO 87/04078号で、コラーゲンとPEGとの間の結合がない水性PEG溶液からのウシコラーゲン（タイプI、II、およびIII）の沈澱を開示した。

【0013】Wernerは、米国特許第4,357,274号で、凍結乾燥の前に、脱脂した組織を過酸化水素またはポリエチレングリコール中に数時間浸すことにより、硬タンパク質（例えば、脳髄膜）の持続性を改良する方法を開示した。得られた変性組織は、全体として存続性が増大する。

【0014】Hiroyoshiは、米国特許第4,678,468号で、水溶性ポリマーが中に分散した、相互貫入網目構造を有

するポリシロキサンポリマーの調製を開示した。水溶性ポリマーはコラーゲン誘導体であり得、そして、このポリマーはさらにヘパリンを含み得る。上記ポリシロキサンポリマーは、血液凝固を阻害するように設計された、人工血管の移植片に成型される。

【0015】他の特許は、骨のフラグメントまたは無機質を組み入れたコラーゲン調製物の使用を開示する。例えば、Miyataらは、米国特許第4,314,380号で、動物の骨セグメントを焼き、次いで、この焼結セグメントをアテロペプチドコラーゲン溶液に浸すことにより調製される骨移植片を開示した。Deibigらは、米国特許第4,192,021号で、糊状の処方物中に、粉末のリン酸カルシウムを生分解性ポリマー（コラーゲンであり得る）と共に含有する移植片材料を開示した。共有に係る米国特許出願第06/855,004号（1986年4月22日出願、現在は放棄されている）は、自己骨髄、コラーゲン、および粒子状リン酸カルシウムを、堅い順応性の処方物中に含有する、特に効果的な骨修復材料を開示した。

【0016】タンパク質の溶解性、免疫原性、および生物学的クリアランスを変化させるポリマーとの共有結合により修飾したタンパク質の技術に関する、いくつかの参考文献がある。例えば、米国特許第4,261,973号では、タンパク質の免疫原性を低下させるための、数種のアレルゲンとPEGまたはPPG（ポリプロピレングリコール）との結合が開示された。米国特許第4,301,144号では、タンパク質の酸素運搬能力を増強するための、ヘモグロビンとPEGおよび他のポリマーとの結合が開示された。ヨーロッパ特許公開第98,110号では、血清中におけるタンパク質の半減期を増大させるために、酵素またはインターフェロンを、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン(POE-POP)ブロックポリマーにカップリングすることが開示された。米国特許第4,179,337号では、免疫原性を低下するための、親水性酵素およびインシュリンと、PEGまたはPPGとの結合が開示された。Davisらは、Lancet (1981) 2:281〜83で、血清中での尿酸の代謝を提供するための、PEGとの結合により修飾された酵素ウリカーゼ（半減期が長く、そして免疫原性が低い）を開示した。Nishidaらは、J Pharm Pharmacol (1984) 36:354〜55で、ニワトリに経口的に投与され、尿酸の血清レベルの減少を示すPEG-ウリカーゼ結合体を開示した。Inadaらは、Biochem & Biophys Res Comm (1984) 122:845〜50で、有機溶媒中に溶解するために、PEGと結合した、リボタンパク質リパーゼを開示した。Takahashiらは、Biochem & Biophys Res Comm (1984) 121:261〜65で、酵素をベンゼン中に溶解させるためにPEGと結合した、HRPを開示した。Abuchowskiらは、Cancer Biochem Biophys (1984) 7:175〜86で、酵素（例えば、アスパラギナーゼ、カタラーゼ、ウリカーゼ、アルギナーゼ、トリプシン、スーパーオキシドジスムターゼ、アデノシンデアミナーゼ、フェニルアラニンアンモニアリア

一ゼ)をPEGと結合させることにより、血清中における半減期が長くなり、そして免疫原性が低下することを開示した。しかしながら、これらの参考文献は、本質的に、水溶液中で、低濃度で投与されるタンパク質の溶解性および生物学的特性を改変することに関する。

【0017】M. Chvapilらは、J Biomed Mater Res (1969) 3:315~32で、コラーゲンスポンジと、エチレングリコールモノメタクリレート-エチレングリコールジメタクリレートが架橋したヒドロゲルとから調製される組成物を開示した。コラーゲンスポンジは、ウシ皮コラーゲンおよびメチルグリオキサール(なめし剤)の水性混合物を凍結乾燥することにより調製された。スポンジ-ヒドロゲル組成物は、エチレングリコールモノメタクリレートおよびエチレングリコールジメタクリレートを上記スポンジ中で重合することにより調製された。

【0018】一連の関連した特許は、種々のタイプのコラーゲン含有材料を開示している。これらの特許としては、米国特許第4,703,108号(1987年10月27日発行)；第4,861,714号(1989年8月29日発行)；第4,863,856号(1989年9月5日発行)；第4,925,924号(1990年5月15日発行)；第4,970,298号(1990年11月13日発行)；および第4,997,753号(1991年3月5日発行)がある。これらの全ての特許は、コラーゲン材料(ここで、タイプI、II、およびIIIコラーゲンは、カルボジイミドまたはスクシンイミジル活性エステルからなる群から選択される架橋剤と接触している)を開示している。望ましい材料の特定のタイプ(例えば、スポンジおよび/またはシート)を形成するために、種々のタイプの処理が、架橋前または架橋後に行われ得る。

【0019】米国特許第5,162,430号において、本発明者らは、親水性合成ポリマー(例えば、ポリエチレングリコール)を用いて結合した種々の形態のコラーゲンによる、化学結合体を記載した。このような結合体は、さまざまな適用(例えば、軟組織の増強、および、骨の修復に有用な移植片の形成)に有用である。米国特許出願第07/907,518号において、本発明者らは、このような結合体を、コラーゲン以外の生体材料を用いて形成することが可能であることを開示している。特に、親水性合成ポリマーが、コラーゲン以外の不溶性の生体適合性で生物学的に不活性な(好ましくは天然に存在する)ポリマーを架橋するのに用いられる。活性化ポリエチレングリコールは、好ましい架橋剤である。本発明者らは、今ここに、グリコサミノグリカンおよび/またはそれらの誘導体の結合体を含む、特定の生体適合性ポリマー結合体およびそれらの合成方法(上記で参照した、同一人に対する先の米国特許第5,162,430号(これは、本明細書中に参考として援用される)に記載されるコラーゲン-ポリマー結合体に類似した様式が用いられ得る)について記載する。

【0020】

【発明の要旨】生体適合性の生物学的に不活性な結合体は、生体適合性で薬学的に受容可能な非免疫原性結合体であり、グリコサミノグリカンおよび/またはその誘導体と、親水性合成ポリマー(例えば、活性化ポリエチレングリコール)とを化学的に結合(例えば、共有結合)することにより形成され、そして必要に応じて、さらに該結合体とコラーゲンまたはその誘導体とを共有結合することにより形成される。

【0021】この結合体は、好ましくは、以下の一般構造式を有する：



ここで、nは0から4までの範囲の整数であり、GAGはグリコサミノグリカンまたはその誘導体であり、そして、Zは0またはO-C=Oである。

【0022】また、この結合体は、好ましくは、以下の一般構造式を有する：



ここで、nは0から4までの範囲の整数であり、GAGは1種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体であり、GAG'は異なる種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体であり、そして、Zは0またはO-C=Oである。

【0023】また、この結合体は、好ましくは、以下の一般構造式を有する：



ここで、nは0から4までの範囲の整数であり、そして、GAGはグリコサミノグリカンまたはその誘導体であり、COLはコラーゲンまたはその誘導体であり、そして、Zは0またはO-C=Oである。

【0024】親水性合成ポリマーは、好ましくは、活性化ポリエチレングリコール(例えば、多官能性ポリエチレングリコール、二官能性ポリエチレングリコール)またはその誘導体であり、約100~約100,000、好ましくは1,500と20,000との間の範囲の平均分子量を有する。結合体を含む組成物は、必要に応じて、さらに注入可能な処方物を形成するための他の成分(例えば、この組成物を注入可能にするには充分な量の薬学的に受容可能な流動性キャリア)、および/または生物学的に活性なタンパク質(例えば、サイトカインまたは増殖因子)を含有し得る。本発明の生体適合性の結合体は、一般に、それが形成されたときには多量の水を含む。結合体は、脱水されると、硬組織の増強(例えば、骨または軟骨の修復または置換)のための比較的堅い移植片(solid implant)を形成する。脱水した堅い移植片は、さらに粒子へと粉砕され得、これは、非水性流体中に懸濁され得、そして、軟組織の増強のために生体中へ注入され得る。堅い移植片または粒子は、所定の場所で、水を再吸収し、そして5倍またはそれ以上の大きさに膨張する。

【0025】本発明は、種々の医療用および薬学的用途において用いられ得る、生体適合性の結合体に関する。

50 最も基本的な実施態様には、生体適合性の結合体および

それらの結合体を用いて処方された薬学的組成物（タイプおよび量の異なる薬学的に受容可能なキャリアをさらに含み得る）が含まれる。結合体は、親水性合成ポリマー、1種またはそれ以上のタイプのグリコサミノグリカンまたはその誘導体、および必要に応じてコラーゲン（好ましくは、繊維性コラーゲンまたは非繊維性コラーゲン）またはその誘導体を含有する。

【0026】本発明の結合体および組成物の最も重要な有用性の一つは、軟組織の増強においてである。組成物は、軟組織を増強する目的で、流動性形態に処方され、そして被験体に注入される（例えば、顔面に）。この方法は、グリコサミノグリカンと合成ポリマーとの反応がインサイチュで起きるように変更され得る。さらに、結合体は、脱水され、次いで粒子へと粉碎され、不活性な非水性キャリア中に懸濁され、そして被験体に注入され得る。注入後、キャリアは通常の生理学的条件で除去され、そして、粒子は水を再吸収し、それらの元の大きさまで膨張する。結合体は、さらに、所望の形状に成形され、次いで脱水されて、硬組織（例えば、哺乳類の硬組織）の増強（例えば、軟骨または骨の修復または置換）に用いるための堅い移植片を形成し得る。

【0027】本発明の結合体は、サイトカインまたは増殖因子と配合され得る。サイトカインは、グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体と共に単に混合され得るか、または、二官能性または多官能性活性化ポリマーと化学的に結合（例えば、グリコサミノグリカン-合成ポリマー-サイトカイン）され得る。単に混合する場合、サイトカインまたは増殖因子は、結合体と化学結合しておらず、さらに投与した部位から周辺の組織へ拡散し得ることにより、持続した放出、および局所的治療効果をもたらす。サイトカインまたは増殖因子がポリマー結合体と化学的に結合している場合、サイトカインまたは増殖因子は、結合体に結合している間その生物学的活性を保持し、そして、ポリマー結合体の侵食により放出もまたされ得る。

【0028】本発明の結合体およびこの結合体を含有する組成物は、広い範囲の治療的用途において有用である。例えば、結合体は、皮膚の傷の治療および心血管への適用において有用であり、そこでは、免疫反応が最小となるか、または血液凝固が回避される。結合体はまた、種々の眼科用用途（例えば、硝子体液に対する体液置換体としての使用、眼への薬物の送達に対する角膜の保護、またはレンチクル(lenticule)としての使用）に用いられ得る。他の用途としては、整形外科手術における結合体の使用、または関節炎の治療における関節潤滑剤としての使用（関節液に対する体液置換体としての使用など）が挙げられる。結合体の他に可能な使用としては、注入可能な薬物または細胞送達系としての使用、皮膚の傷の包帯剤(dressing)としての使用、または体内で長期間使用することを意図した堅い移植片のコーティ

ングとしての使用が挙げられる。

【0029】結合体は、さらに、種々の形態へ作製され得、これには、膜、ビーズ、スポンジ、チューブ、シート、および形成移植片が挙げられるが、これらに限定されない。形成移植片は、種々の器官および身体部分（例えば、心臓弁、膝蓋骨、耳、鼻、頬骨など）の修復、増強、または置換のための人工デバイスとして用いられ得る。

【0030】本発明の第一の特徴は、合成ポリマー（例えば、活性化ポリエチレングリコール）と1種またはそれより多い種のグリコサミノグリカンとを共有結合することにより形成される、生体適合性の結合体を提供することである。

【0031】本発明の他の特徴は、コラーゲンとさらに共有結合しているグリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体を提供することである。

【0032】本発明の他の特徴は、結合体が分散した薬学的に受容可能な流動性キャリアを含有する、薬学的に受容可能な非免疫原性の組成物を提供することである。

【0033】本発明の他の特徴は、生体適合性のグリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体を形成する工程、該結合体を脱水して固形物を形成する工程、該固形物を粒子に粉碎する工程、該粒子を、薬学的に受容可能な非水性流動性キャリア中に懸濁させる工程、および、該懸濁液を増強する部位へ注入する（その後、該粒子は水を再吸収し、所定の大きさに膨張する）工程を包含する、組織を増強する方法を提供することである。

【0034】本発明の重要な利点は、グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体が、従来のグリコサミノグリカン組成物と比較して、インビボでのより高度な安定性を有することである。

【0035】本発明の他の特徴は、グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体が、組成物の物理的特性を調節するために、異なる分子量の範囲の合成ポリマーを用いて形成され得ることである。

【0036】本発明の他の利点は、グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体が、従来のグリコサミノグリカン組成物と比較して、優れた取り扱い特性を有することである。

【0037】本発明の他の利点は、グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体組成物が、従来のコラーゲン組成物と比較して、免疫反応を低下させることである。

【0038】本発明の他の利点は、グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体組成物が、従来のグリコサミノグリカン組成物と比較して、成形性、順応性、および弾性について改良されることである。

【0039】本発明の他の特徴は、生理学的条件下で、例えば、サイトカインまたは増殖因子の活性および利用可能な半減期を改良するために、組成物および結合体を、薬学的に活性なタンパク質（例えば、サイトカイン

または増殖因子)と組み合わせて処方する能力を含む。

【0040】本発明の他の特徴は、グリコサミノグリカンまたはそれらの誘導体が、種々のタイプの共有結合(エステル結合、エーテル結合、ウレタン結合、 $-(CH_2)_n-NH-$ 結合を含む)によって、合成ポリマーと結合し得ることである。

【0041】本発明の他の利点は、共有結合を形成して結合体を合成(create)するために、エーテル結合が用いられ得ること、および、この結合が加水分解に対して耐性であることである。

【0042】本発明の他の利点は、共有結合したグリコサミノグリカン-合成ポリマー-コラーゲンを含有する三部分結合体が、グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体またはコラーゲン-合成ポリマー結合体のいずれか一方だけとは異なる物理的および化学的特性(この特性は、組成物中のグリコサミノグリカンおよびコラーゲンの相対的比率を変化させることにより、所望のように操作され得る)を有することである。

【0043】本発明の他の特徴は、以下の工程: 化学的に誘導体化したグリコサミノグリカンの水溶液を提供する工程; 活性化合成ポリマーの溶液を添加して、反応混合物を形成する工程であって、該活性化合成ポリマーが、該化学的に誘導体化したグリコサミノグリカンの利用可能なアミノ基と共有結合を形成し得る反応基を有する親水性合成ポリマーを包含する工程; および該活性化合成ポリマーと該グリコサミノグリカンとの共有結合を形成する工程; を包含する、哺乳類への投与に適切なグリコサミノグリカン-ポリマー結合体を調製する方法を提供することである。

【0044】本発明の他の特徴は、以下の工程: 少なくとも1種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体と、二官能性活性化親水性合成ポリマーとを共に混合することにより、注入可能な組成物を調製する工程; および混合後直ちに、該組成物を増強が必要な軟組織部位へ注入し、注入後インサイチュで、該グリコサミノグリカンを含むポリマーとコラーゲンとの化学結合体が連続して形成される、工程; を包含する、哺乳類の軟組織を増強する方法を提供することである。

【0045】本発明の他の特徴は、生体適合性の生物学的に不活性な結合体を含有する組成物を、増強が必要な硬組織部位へ、注入または外科的移植によって付与する工程を包含する、哺乳類の硬組織を増強する方法であって、該結合体が、少なくとも1種のグリコサミノグリカンまたはその誘導体と化学的に結合した二官能性活性化親水性合成ポリマーを含み、そして、実質的に全ての結合していない水を除去するために脱水されている、方法を提供することである。

【0046】本発明のこれらの特徴および他の特徴は、グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体の構造、合成、および取り扱いに関する以下の詳細な説明を理解す

ることにより、当業者に明らかとなる。

【0047】

【発明の構成】

(相互参照) 本願は、1988年11月21日出願の米国特許出願第07/274,071号(後に放棄した)の一部継続出願である米国特許第5,162,430号(1992年11月10日発行)の一部継続である、1992年7月2日出願の同時係属米国特許出願第07/907,518号の一部継続出願である。これらの出願および特許は、その全ての内容について本明細書中に参考として援用され、そして、これらに対して米国特許法第120条に基づく優先権が主張されている。

【0048】(発明の好ましい実施態様の詳細な説明) 本明細書中で用いる単数の形態は、文中で特にことわりのない限り、複数の指示物を包含することに注意すべきである。従って、例えば、「ポリマー」との表記は、そのような複数のポリマーの混合物を包含し、「結合基」または「架橋基」との表記は、当業者に公知かまたは共有結合を形成し得る、1種またはそれ以上の異なるタイプの基を包含し、そして、「合成ポリマー」との表記は、異なるタイプの複数の合成ポリマー(例えば、種々の活性化ポリエチレングリコールなど)の混合物を包含する。

【0049】他に定義しなければ、本明細書中で用いる全ての技術用語および科学用語は、本発明の属する当業者に一般に理解されるのと同様の意味を有する。本明細書に記載されるのと類似するか、または同等の任意の方法および材料が、本発明の実施または試験において有用であり得るが、好ましい方法および材料のみについて以下に記載される。しかしながら、本発明が、これらの好ましい実施態様に限定されることは意図しない。

【0050】本明細書中に記載される全ての文献は、本明細書中に参考として援用される。さらに、本発明の説明に特に重要な特定の用語を以下に定義する。

【0051】(定義) 用語「グリコサミノグリカン」は、同一の糖サブユニットまたは2種の異なる糖サブユニットのいずれかを繰り返しユニットとして有する、生物学的に活性でない(つまり、リガンドまたはタンパク質のような化合物ではない)複合多糖を包含することを意図する。グリコサミノグリカンのいくつかの例としては、デルマトン硫酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、キチン、キトサン、ヘパリン、ケラタン硫酸、ケラト硫酸、およびそれらの誘導体が挙げられる。一般に、グリコサミノグリカンは、天然ソースから抽出され、精製され、そして誘導体化される。しかしながら、それらは、合成的に製造され得るか、または、改変した微生物(例えば、細菌)により合成され得る。

【0052】用語「ヒアルロン酸」は、天然に存在するポリマーおよび合成ポリマーの形態 $-(C_6H_7O_6N)_n \cdot (C_6H_7O_6)_m$ (n=1~約5,000)、およびそれらの誘導体を包含することを意図する。特に好ましい誘導体として

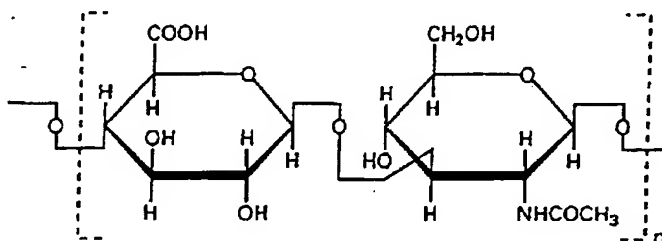
は、他の分子と化学反応して共有結合を形成する官能化部分を有する誘導体（例えば、脱アセチル化ヒアルロン酸）が挙げられる。この化合物は、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸とが交互に1,4結合したユニットを繰り返しユニットとして含む。ヒアルロン酸は、哺乳類*

*の体液および結合組織において見いだされる、粘性のある高分子量のムコ多糖である。ヒアルロン酸の構造式を以下に示す。

【0053】

【化1】

ヒアルロン酸



D-アセチルグルコサミンとグルクロン酸とが

交互に1,4結合した繰り返しユニット

【0054】ここで、 n は、1～約5,000の範囲である。

※ドロイチン硫酸Aの異性体である）；およびコンドロイ

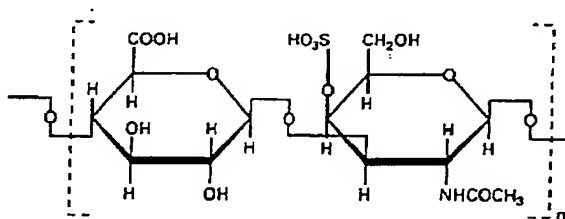
【0055】本明細書中で用いる用語「コンドロイチン硫酸」は、以下の3種の主要な化合物を包含することを意図する：コンドロイチン硫酸A；デルマタン硫酸（コンドロイチン硫酸Bとしても知られており、これはコン※

チン硫酸C。これら3種の化合物の構造を以下に示す。

【0056】

【化2】

コンドロイチン硫酸A



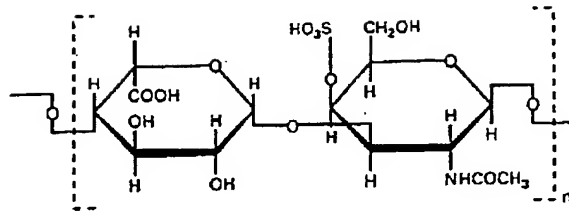
コンドロイチン硫酸Aの繰り返しユニット

【0057】ここで、 n は、約10～約300の範囲である；

【化3】

【0058】

40

デルマタン硫酸

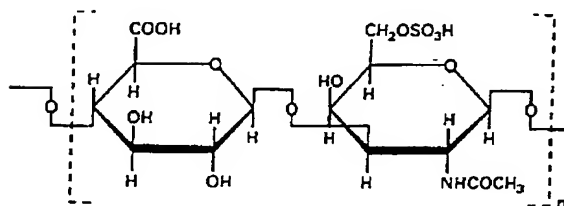
デルマタン硫酸の繰り返しユニット

(コンドロイチン硫酸B)

【0059】ここで、nは、約10～約300の範囲である。 * 【化4】

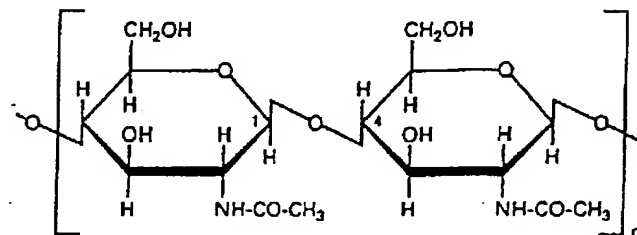
【0060】

*

コンドロイチン硫酸C

コンドロイチン硫酸Cの繰り返しユニット

【0061】ここで、nは、約20～約200の範囲である； ※チンの構造を以下に示す。
 用語「キチン」は、N-アセチルグルコサミンの繰り返し 【0062】
 ユニットを含むポリマーを包含することを意図する。キ※30 【化5】

キチン

N-アセチルグルコサミン

N-アセチルグルコサミン

【0063】ここで、nは、約500～約2,000の範囲である。

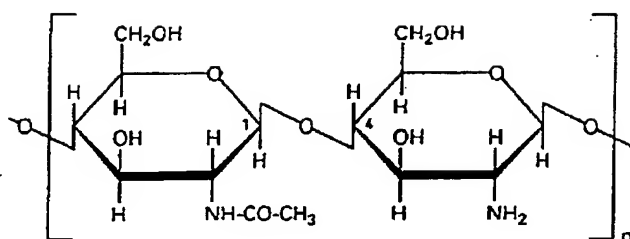
【0064】用語「キトサン」は、部分的に脱アセチル化されたキチンおよび完全に脱アセチル化されたキチンの両方を意味する。

【0065】用語「キトサン1」は、以下に示すような部分的に脱アセチル化されたキチンを意味する。

【0066】

【化6】

キトサン1



N-アセチルグルコサミン

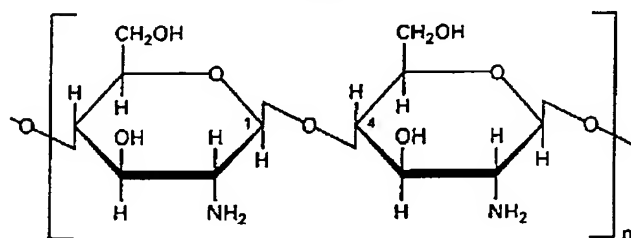
(部分的に脱アセチル化されたキチン)

【0067】ここで、 n は、約500～約2,000の範囲である *完全に脱アセチル化されたキチンを意味する。

【0069】

【0068】用語「キトサン2」は、以下に示すような* 【化7】

キトサン2



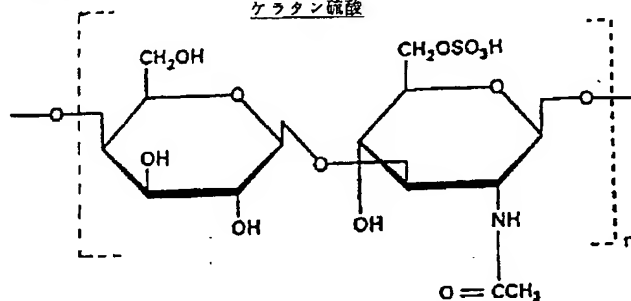
完全に脱アセチル化されたキチン

【0070】ここで、 n は、約500～約2,000の範囲である ※返し構造を有するポリマーを意味する。

【0072】

【0071】用語「ケラタン硫酸」は、以下に示す繰り※30 【化8】

ケラタン硫酸

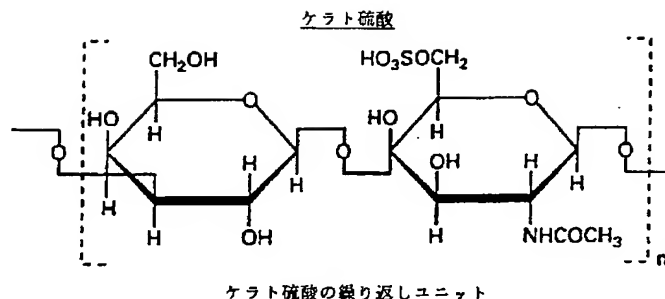


ケラタン硫酸の繰返しユニット

【0073】ここで、 n は、約10～約100の範囲である。を意味する。

【0074】用語「ケラト硫酸」は、以下に示す繰返し構造を有する、ケラタン硫酸の異性体であるポリマー 【化9】

【0075】



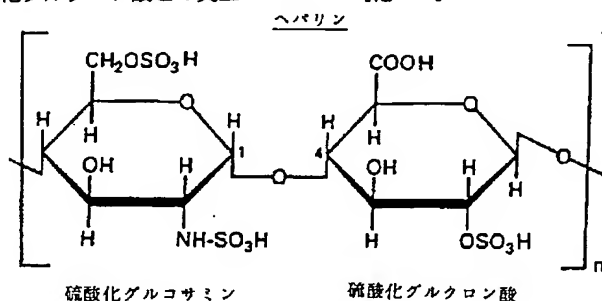
【0076】ここで、 n は、約10～約100の範囲である。

* ットを含むポリマーを意味する。

【0077】用語「ヘパリン」は、以下に示すように、
硫酸化グルコサミンと硫酸化グルクロン酸との交互ユニ

【0078】

【化10】



【0079】ここで、 n は、約2～約3,000の範囲である。

【0080】用語「生物学的に不活性なポリマー」、「生体適合性ポリマー」、および「生物学的に不活性で生体適合性のポリマー」は、本明細書中では交換可能に用いられる。これらの用語は、親水性合成ポリマーと共有結合して本発明の結合体を形成し得る、生物学的に不活性で不溶性の生体適合性ポリマーおよびそれらの誘導体を意味する。これらの用語は、生物学的に不活性で不溶性の非毒性のポリマーであって、生体（例えば、ヒト）に組み込まれても、いかなる有意な免疫反応をも生じさせないポリマーを包含する。

【0081】本発明の使用に好ましい合成ポリマーは、親水性であり、そして高度に純粋であるか、または高度に純粋な状態（ポリマーが被験体（ヒトを含む）に注入され得るように薬学的に純粋である程度またはその状態まで処理される程度）まで精製される。最も親水性の合成ポリマーは、水溶液中で水素結合を形成させるために、十分な数の酸素原子を組み込むことにより（または、あまり用いないが、窒素原子を組み込むことにより）水溶性にされ得る。好ましい合成ポリマーは、親水性であるが、必ずしも水溶性ではない。本明細書中では、親水性合成ポリマーとしては、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリオキシエチレン、ポリメチレングリコール、ポリトリメチレングリコール、ポリビニルピロリドン、およびそれらの誘導体の活性化形態が挙げられ、

活性化PEGが特に好ましい。合成ポリマーは、直鎖状であり得るかまたは多岐状であり得るが、典型的には、実質的に架橋していない。他の適切な親水性合成ポリマーとしては、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックポリマーおよびコポリマーが挙げられる。エチレンジアミン核を有する（従って、4つの末端を有する）ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックポリマーは、市販されており、そして本発明の実施に用いられ得る。天然に存在するポリマー（例えば、タンパク質、デンプン、セルロース、ヘパリン、ヒアルロン酸、およびそれらの誘導体など）は、この定義の範囲から明らかに除外される。全ての適切な合成ポリマーは、皮下投与されたときに、非毒性、非炎症性、そして非免疫原性であり、そして好ましくは、少なくとも数カ月の期間にわたって、インビボで本質的に非分解性である。親水性合成ポリマーは、結合体の親水性を増強し得るが、水溶性にはならない。最も好ましい親水性合成ポリマーとしては、一官能性、二官能性、および多官能性活性化ポリエチレングリコール(PEG)が挙げられる。一官能性活性化PEGは、一つの反応性のヒドロキシ基のみを有するのに対して、二官能性活性化PEGは、各末端に反応性の基を有する。一官能性活性化PEGは、好ましくは約100と約15,000との間、さらに好ましくは約200と約8,000との間、そして最も好ましくは約5,000の平均分子量を有する。二官能性活性化PEGは、好ましくは約400～約40,000、さらに好ましくは約3,000と約10,000との間

の平均分子量を有する。多官能性活性化PEGは、好ましくは、約3,000と100,000との間の平均分子量を有する。

【0082】PEGは、一つの末端でアルキレンエーテル基を形成することにより、一官能性で活性化され得る。アルキレンエーテル基は、1～6個の炭素原子を有する任意の適切なアルコキシ基であり得、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、2-プロポキシ、ブトキシ、ヘキシルオキシなどであり得る。現在のところ、メトキシが好ましい。二官能性活性化PEGは、直鎖状分子の各末端に反応性のヒドロキシ基を与えることにより提供される。反応性の基は、好ましくは、ポリマーの末端に位置するが、その鎖状方向わたって提供されてもよい。多官能性活性化合成ポリマーは、本発明の組成物を架橋し得、そしてさらに、サイトカインまたは増殖因子とグリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体とを結合するために用いられ得る。

【0083】用語「非免疫原性」は、被験体（ヒトを含む）の体内への注入、あるいは移植がなされたときに、有意な抗原反応またはアレルギー反応を生じさせない分子および組成物を意味する。

【0084】本明細書中で用いる用語「化学的に結合した」は、化学的共有結合を介して結合していることを意味する。本発明の実施において、親水性合成ポリマーとグリコサミノグリカンまたはその誘導体とが、結合基を用いることにより化学的に結合され得る。従って、親水性合成ポリマーおよびグリコサミノグリカンは、それぞれ結合基に結合するが、互いに直接は結合しない。

【0085】用語「生体適合性の結合体」は、本発明における意味の中では、親水性合成ポリマーと化学的に結合した生物学的に不活性な生体適合性のポリマーを意味する。例えば、「PEG-ヒアルロン酸」とは、ヒアルロン酸がPEGと化学的に結合している本発明の組成物を示す。親水性合成ポリマーは、多くの異なるタイプの化学的結合を介して、グリコサミノグリカン（例えば、ヒアルロン酸）と「化学的に結合」され得る。例えば、この結合は、エステルまたはウレタン結合を介していてもよいが、さらに好ましくはエーテル結合を介している。毒性化学物質を使用せずに形成され得ること、およびインビボで加水分解を容易には受けけないという点で、エーテル結合が好ましい。

【0086】親水性合成ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）は、正確な分子量を有するように実際には調整され得ないこと、および、本明細書中で用いる用語「分子量」は、当該分野において一般に用いられる任意の所定の試料中の多数の分子の重量平均分子量を意味することが当業者に理解される。従って、PEG 2,000の試料は、例えば、1,500～2,500の重量範囲のポリマー分子の統計学的混合物を含み得、1つの分子は、ある範囲にわたって他の分子とわずかに異なる。分子量範囲の記載により、平均分子量が、指定した範囲

の間のいかなる値でもよく、そしてこれらの制限を越える分子を包含し得ることが示される。従って、約800～約20,000の分子量範囲は、少なくとも約800～約20,000までの範囲の平均分子量を示す。

【0087】本明細書中で用いる用語「使用可能なリン残基」は、活性化PEGと反応する様式で位置する、天然ポリマー分子の外側表面上にさらされたりリン側鎖を意味する。使用可能なリン残基の数は、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(TNBS)との反応により決定され得る。

【0088】本明細書中で用いる用語「処置」および「治療」は、欠損、特に、軟組織または軟組織支持体の損失または欠落、あるいは骨の損失または欠落による欠損の置換、増強、修復、予防、または緩和を意味する。さらに、「処置」および「治療」はまた、本発明の結合体-含有組成物と結合した生物学的に活性なタンパク質を用いた、障害または疾患の予防、維持、または緩和を意味する。従って、軟組織の治療としては、軟組織の増強（例えば、皮膚のしわまたは溝の除去において、または、老化のために脂肪が失われる上顎部分の皮下脂肪の置換において、通常のまたは所望の皮膚外形を再形成するための本発明の結合体の移植）、または粘膜下組織（例えば、泌尿系括約筋または食道下部括約筋）の増強における軟組織の増強が挙げられる。骨および軟骨の治療としては、骨組織を置換または修復するための（例えば、骨偽関節または骨折の治療における）、生体適合性の結合体の使用、特に、適切な粒子状材料と組み合わせた生体適合性の結合体の使用が挙げられる。骨の治療にはまた、付加的な骨増殖因子を存在させて、または存在させずに、結合体-含有組成物を使用することが挙げられる。セラミック粒子（好ましくは、ヒドロキシアパタイトおよび/またはリン酸三石灰）と共に結合体を含む組成物は、優れた引張強度のために応力に耐える骨を修復するのに特に有用である。

【0089】用語「サイトカイン」および「増殖因子」は、複数の増殖因子および複数の活性化ペプチドを包含して、正常組織の回復または再増殖を促進する生物学的に活性な分子および活性なペプチド（天然に存在し得るか、または合成され得る）を記載するのに用いられる。サイトカインの機能は、以下の二点である：（1）これらは、新しいコラーゲンまたは組織をつくるために局所細胞を刺激し得るか、または（2）これらは、修正を必要とする部位へ細胞を誘引し得る。このように、サイトカインおよび増殖因子は、移植片の「生物学的つなぎとめ(biologicalanchoring)」を宿主組織内で促進させるために作用する。前記のように、サイトカインは、結合体と混合され得るか、または結合体と化学的に結合され得るか、あるいは、ある結合体は、サイトカイン（例えば、インターフェロン(IFN)、腫瘍壊死因子(TNF)、インターロイキン、コロニー刺激因子(CSF)

25

など)、または増殖因子(例えば、骨形成因子抽出物(osteogenic factor extract)(OFE)、上皮増殖因子(EGF)、形質転換増殖因子(TGF) α 、TGF- β (TGF- β のいかなる組み合わせも包含する)、形質転換増殖因子 β 1(TGF- β 1)、形質転換増殖因子 β 2 TGF- β 2、血小板由来増殖因子AA(PDGF-AA)、血小板由来増殖因子AB(PDGF-AB)、血小板由来増殖因子BB(PDGF-BB)、酸性線維芽細胞増殖因子(FGF)、塩基性FGF、結合組織活性化ペプチド(CTAP)、 β -トロンボグロブリン、インシュリン様増殖因子、エリスロポエチン(EPO)、神経成長因子(NGF)、骨形態形成タンパク質(bone morphogenic protein)(BMP)、骨形成因子など)を組み込み得る。好ましくは、この結合体は、形質転換増殖因子 β 、形質転換増殖因子 β 1、形質転換増殖因子 β 2、およびエリスロポエチンからなる群から選択される増殖因子を組み込み得る。このようなサイトカイン、増殖因子、およびサイトカインと増殖因子との適切な組み合わせを取り込むことにより、移植片の正常組織への再増殖および再形成が促進されるか、または傷の治療に用いられ得る。さらに、合成段階で、多官能性活性化合成ポリマー分子を適量用いることにより、サイトカインまたは増殖因子は、グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体と化学的に結合し得る。次いで、活性化PEGとグリコサミノグリカンとを結合させるのに用いたのと同様の方法によって、または任意の他の適切な方法によって、サイトカインまたは増殖因子が、多官能性活性化合成ポリマーの官能部位に結合され得る。サイトカインまたは増殖因子分子を移植片につなぎとめることにより、効果的な治療に必要とされるサイトカインまたは増殖因子の量が、実質的に減少する。サイトカインまたは増殖因子が組み込まれた結合体は、効果的なコントロールされた放出薬物送達手段として機能し得る。グリコサミノグリカンと合成ポリマーとの間の化学結合を変化させることによって、サイトカインまたは増殖因子の放出に関する効果を変化させることが可能である。例えば、「エステル」結合が用いられると、結合は生理学的条件下でより容易に切断され、マトリックスからの増殖因子またはサイトカインの放出が維持される。しかしながら、「エーテル」結合が用いられると、結合は容易には切断されず、そして、サイトカインまたは増殖因子は、そのさらされている活性部位と共に、より長期間その場所に残留し、タンパク質の活性部位に対する本来の基質についての生物学的効果を提供する。サイトカインまたは増殖因子の放出に関する効果の多様性を得るために、異なる結合を有する結合体の混合物を含むことが可能である。つまり、所望の放出速度を得るために、放出持続効果が変更され得る。

【0090】用語「有効な量」は、所望する効果を得るために要求される組成物の量を意味する。従って、サイトカインまたは増殖因子を含有する組成物の「組織の増殖を促進する量」とは、検出可能な程度に組織の増殖を

26

刺激するのに必要とされるサイトカインまたは増殖因子の量を意味する。ここでいう組織とは、結合組織、骨、軟骨、上皮および真皮、血液、および他の組織を包含する。有効な量であるとされる実際の量は、さまざまな因子(例えば、患者の大きさ、病状(condition)、性別、および年齢)に依存して変化し、医師(caregiver)により容易に決定され得る。

【0091】本明細書中で用いる用語「十分な量」は、本発明の結合体と組み合わせ用いられるキャリアの量を示すのに用いられる。十分な量とは、それを結合体と混合したときに、所望の物理的形態(例えば、注入可能な溶液、注入可能な懸濁液、可塑性または順応性の移植片、ストレスを有する堅い移植片など)が得られる量である。注入可能な処方物は、一般に、組成物をなめらかで注入可能にするのに十分な流動性キャリアの量を含むのに対して、順応性の移植片は、キャリアの量が実質的に少量であり、そして粘度様の稠度を有する。ストレスを有する堅い移植片は、キャリアを全く含み得ず、そして高度の構造的完全性を有し得る。キャリアの量は、用いる特定の結合体、および所望する最終結果に依存して変化し、そして調節され得る。このような調節は、本発明の開示を読むことにより当業者に明らかとなる。

【0092】本明細書中で用いる用語「適切な粒子状材料」は、実質的に水に不溶であり、非免疫原性であり、生体適合性であり、そしてコラーゲン-ポリマー結合体と混和しない粒子状材料を意味する。材料粒子は、繊維状でもあり得、直径約20~250 μ mの大きさの範囲であり得、そして、形状がビーズ様または不規則であり得る。典型的な粒子状材料としては、繊維性架橋コラーゲン、ゼラチンビーズ、架橋コラーゲン-dPEG粒子、ポリテトラフルオロエチレンビーズ、シリコーンゴムビーズ、ヒドロゲルビーズ、炭化ケイ素ビーズ、およびガラスビーズが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい粒子状材料としては、リン酸カルシウム、最も好ましくは、ヒドロキシアパタイト粒子および/またはリン酸三石灰粒子がある。

【0093】用語「堅い移植片」は、体内での挿入および使用のために設計される任意の固形物を意味し、そしてこれには、骨および軟骨移植片(例えば、金属、プラスチック、および/または他の材料から構成される人工関節、保持ピン(retaining pin)、頭蓋プレートなど)、胸部移植片(例えば、シリコーンゲルエンベロープ、発泡体など)、長期間(約3日を越える)の使用を意図したカテーテルおよびカニューレ、人工器官および管(例えば、人工心臓、膀胱、腎臓、血管など)、薬物送達用デバイス(モノリスの移植片、およびコントロールされたポンプ放出デバイス(例えば、Alzet(登録商標)ミニポンプ)、同化成長または避妊のためのステロイドベレットなどを包含する)、皮膚または内部使用のための縫合糸、歯根膜、レンチクル、角膜シールド、動

脈瘤治療のためのプラチナワイヤーなどが挙げられる。

【0094】本明細書中で用いる用語「適切な繊維材料」は、実質的に水に不溶であり、非免疫原性であり、生体適合性であり、そして本発明の生体適合性の結合体と混和しない繊維材料を意味する。繊維材料は、これらの特性を有する種々の材料を包含し得、そして、医療用および薬学的用途に関連して用いられる種々の移植片またはデバイスの構造的完全性を形成および/または提供するために、結合体組成物と組み合わせられる。例えば、本発明の結合体組成物は、「適切な繊維材料」上位に被覆され得、つまり、骨の周りを被覆し得ることにより、骨の構造的完全性が提供される。従って、「適切な繊維材料」は、本発明の「堅い移植片」を形成することにおいて有用である。

【0095】本明細書中で用いる用語「インサイチュ」は、「投与の部位で」を意味する。従って、注入可能な反応混合組成物は、増強が必要な部位へ注入されるか、あるいは付与され、そして注入部位で架橋する。適切な部位は、一般に、皮膚の支持を増強するためには皮内または皮下領域であり、傷の治癒および骨の修復のためには骨折部位であり、そして、括約筋増強のためには（例えば、節制の回復のためには）括約筋組織内である。

【0096】用語「水性混合物」としては、天然ポリマーおよび水を含有する流体溶液、懸濁液、分散体、コロイドなどが挙げられる。

【0097】用語「コラーゲン」は、動物の骨、軟骨、皮膚、および結合組織を形成する細胞外マトリックスの主要タンパク質成分である物質、およびその誘導体物質を表す従来の意味で用いられる。天然型のコラーゲンは、典型的には剛直なロッド状の分子で、長さおよそ300nmおよび直径1.5nmである。このコラーゲンは、3本のコラーゲンポリペプチドからなり、密着した3重らせんを形成している。コラーゲンポリペプチドは繰り返し配列-Gly-X-Y-を有する長い中央部分により特徴付けられ（ここで、XおよびYはしばしばプロリンまたはヒドロキシプロリンである）、各末端は「テロペプチド」領域（分子の約5%未満を構成する）と結合している。コラーゲン鎖のテロペプチド領域は、典型的には、鎖間での架橋、およびタンパク質の免疫原性が授与される。コラーゲンには数種類の「型」があり、それぞれ異なる物理的特性を有する。最も豊富な型は、I型～III型である。本発明の開示は、これらのコラーゲン、および他の公知の型のコラーゲン（天然コラーゲン、および加工または修飾したコラーゲン（つまり、種々のコラーゲン誘導体）を包含する。コラーゲンは、典型的には、天然ソース（例えば、ウシの皮、軟骨、または骨）から単離される。骨からは通常、乾燥、脱脂、粉碎、そして無機質脱着を行ってコラーゲンが抽出される。一方、皮および軟骨は、通常、細かく刻まれ、そしてコラーゲナーゼ以外のタンパク質分解酵素で消化される。コラ

ーゲンは、大部分のタンパク質分解酵素に耐性であるが、好都合には、この手法によりコラーゲンと共に存在する不純タンパク質の大部分が除去される。

【0098】用語「脱水された」は、実質的に全ての結合していない水を除去するために、材料を空気乾燥するか、または凍結乾燥することを意味する。

【0099】（一般的方法）本発明の結合体を形成するために、グリコサミノグリカンは、一般に、化学的に誘導体化され、次いで、官能性活性化親水性合成ポリマーと共有結合する。これは、多くの適切な方法を用いて達成され得る。ある方法に従えば、（1）親水性合成ポリマーが活性化され、（2）グリコサミノグリカンが、脱アセチル化および/または脱硫酸化による化学的修飾を受け、そして（3）活性化合成ポリマーと化学的に修飾されたグリコサミノグリカンとが反応する。

【0100】（ポリエチレングリコール(PEG)の活性化）本発明の結合体を形成する第一工程には、一般に、親水性合成ポリマーの官能化または活性化が含まれる。合成法の異なる親水性合成ポリマーが、結合体を形成するのに関連して用いられ得るが、このポリマーは、生体適合性であり親水性であるが、相対的に不溶性でなければならず、そして好ましくは、生体適合性が知られていることから1種またはそれより多い誘導体化されたポリエチレングリコール(PEG)である。種々の形態の誘導体化されたPEGが、生物学的に活性な分子の修飾に広く用いられる。なぜなら、PEGは、広範囲の溶解性を有するように処方され得、そして、それは、毒性、抗原性、免疫原性がなく、そして典型的には酵素活性および/またはペプチドの配座を妨げないからである。さらに、PEGは、一般に非生分解性であり、そしてヒトを含む殆どの生体から容易に抽出される。

【0101】種々の官能化ポリエチレングリコールが、さまざまな分野（例えば、タンパク質修飾（Abuchowskiら、Enzymes as Drugs, John Wiley&Sons: New York, NY(1981) 367~383;およびDreborgら、Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst. (1990) 6:315を参照のこと）、ペプチドの化学（Mutterら、The Peptides, Academic: New York, NY 2:285~332;およびZalipskyら、Int. J. Peptide Protein Res. (1987) 30:740を参照のこと）、およびポリマー薬物の合成（Zalipskyら、Eur. Polym. J. (1983) 19:1177;およびOuchiら、J. Macromol. Sci.-Chem. (1987) A24:1011を参照のこと）において効果的に用いられてきた。活性化（官能化）ポリエチレングリコールと薬学的に活性な特定のタンパク質との結合により形成される種々のタイプの結合体は、生体器官内におけるタンパク質の分解消化、免疫原性の低下、および半減期の増加に関連する安定性を有するために、部分的な医療用途に有用であることがすでに開示され、そして認められている。

【0102】特に有用であると認められるポリエチレン

グリコールの一形態は、モノメトキシポリエチレングリコール(mPEG)であり、これは、塩化シアヌールのような化合物の添加により活性化され得、次いでタンパク質と結合し得る(Abuchowskiら、J. Biol. Chem. (1977) 252:3578を参照のこと)。活性ポリエチレングリコールのこのような製造方法は、本発明に関して用いられ得るが、これらの方法は、塩化シアヌールが比較的毒性であり、そして薬学的に受容可能な組成物を提供するためには、得られたいずれの製造物からこの塩化シアヌールを除去しなければならないので、特に好ましくはない。

【0103】PEGの活性化形態(mPEGの活性化形態を包含する)は、市販で購入され得る反応成分から作製され得る。本発明に関して特に有用であると認められる活性化PEGの一形態は、mPEG-スクシネート-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SS-PEG)である(Abuchowskiら、Cancer Biochem. Biophys. (1984) 7:175を参照のこと)。SS-PEGのようなPEGの活性化形態は、比較的穏やかな条件下でタンパク質と反応し、そして、PEGと結合したタンパク質の特定の生物学的活性および特異性を損なうことなく結合体を製造する。しかしながら、このような活性化PEGは、タンパク質と反応する際、エステル結合を介した結合を形成する。エステル結合は本発明に関して用いられ得るが、それらは、長期間にわたって生理学的条件下に供されると加水分解を受けるので、特に好ましくはない(Dreborgら、Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst. (1990) 6:315; およびUlbrichら、J. Makromol. Chem. (1986) 187:1131を参照のこと)。

【0104】ウレタン結合を介してPEGとタンパク質とを結合させることは可能であり、それによって、エステル結合よりも加水分解に対してさらに耐性のさらに安定な結合が提供される(Zalipskyら、Polymeric Drug and Drug Delivery Systems、第10章、「ポリエチレングリコールのスクシンイミジルカーボネート」(1991)を参照のこと)。ウレタン結合の安定性は、生理学的条件下において示された(Veroneseら、Appl. Biochem. Biotechnol. (1985) 11:141; およびLarwoodら、J. Labelled Compounds Radiopharm (1984) 21:603を参照のこと)。PEGとタンパク質とを結合させる他の手段は、カルバメート結合によるものであり得る(Beauchampら、Anal. B

iochem. (1983) 131:25; およびBergerら、Blood (1988) 71:1641を参照のこと)。カルバメート結合は、カルボニルジイミダゾール-活性化PEGを用いることにより生成される。この結合はいくつかの利点を有するが、反応は比較的遅く、そして完結するのに2~3日かかり得る。

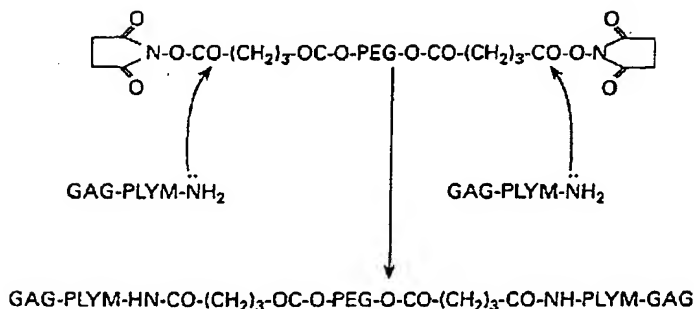
【0105】上記のPEGを活性化する種々の手段および活性手段に関して引用した文献では、PEGと特定の生物学的に活性なタンパク質とを結合することに関して記載されているが、不活性な(生物学的に活性でない)天然ポリマーと結合することは記載されていない(Polymeric Drug and Drug Delivery Systems、第10章、「ポリエチレングリコールのスクシンイミジルカーボネート」(1991)を参照のこと)。しかしながら、本発明は、このような活性化PEG化合物が、不活性で生体適合性の結合体の形成に関して用いられ得ることを開示するものである。このような結合体は、一連の改良された予想し得ない特性を提供し、そして、本発明の種々の組成物を形成するために用いられ得る。

【0106】(活性化PEGの特定の形態)本発明の使用に対して、ポリエチレングリコールは、分子の1末端、または、好ましくは2またはそれより多い末端に活性化基を提供するために修飾され、これによって、PEGと化学的に誘導体化されたグリコサミノグリカン上のフリーのアミノ基との間に共有結合が生じ得る。PEGのいくつかの特定の活性化形態を構造式で以下に示す。これは、PEGの活性化形態と誘導体化されたグリコサミノグリカンとを反応させることにより得られる一般的な反応生成物である。式1~7において、用語GAG-PLYMは、化学的に誘導体化されたグリコサミノグリカンポリマーを表すのに用いられる。

【0107】最初の活性化PEGは、二官能性活性化PEGスクシンイミジルグルタレートであり、本明細書中では(SG-PEG)と表記する。この分子の構造式、およびグリコサミノグリカン誘導体とこの分子を反応させて得られる反応生成物を式1に示す。

【0108】

【化11】



式1

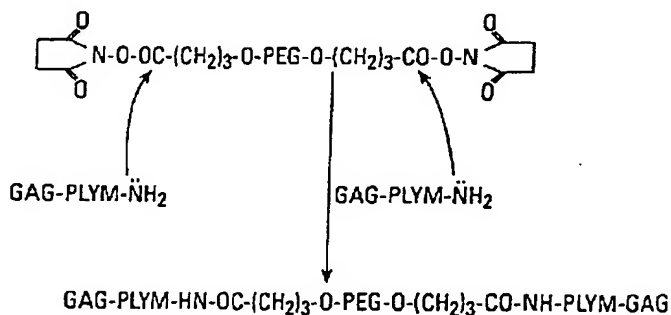
【0109】他のPEGの二官能性活性化形態は、PEGスクシンイミジル(S-PEG)と称される。この化合物の構造式、およびグリコサミノグリカン誘導体(例えば、脱アセチル化ヒアルロン酸)とこの化合物を反応させて得られる反応生成物を式2に示す。この化合物の任意の一般構造式においては、この式2中の下付き文字3は、「n」で置換される。式1に示される実施態様においては、PEGの両側に繰り返しのCH₂基が3つあるので、nは*

*3である。式2における構造体は、加水分解を受けない「エーテル」結合を含む結合体である。これは、エステル結合が提供された式1に示される結合体とは異なる。このエステル結合は、生理学的条件下で加水分解を受ける。

【0110】

【化12】

S-PEG, n=3: 二官能性活性化PEGスクシンイミジル



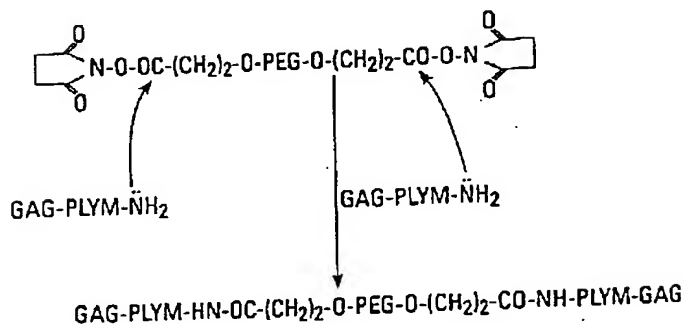
式2

【0111】さらに、PEGの他の二官能性活性化形態(n=2)を式3に示す。活性化PEGとグリコサミノグリカン誘導体とを反応させることにより形成される結合

体を、式3に示す。

【0112】

【化13】



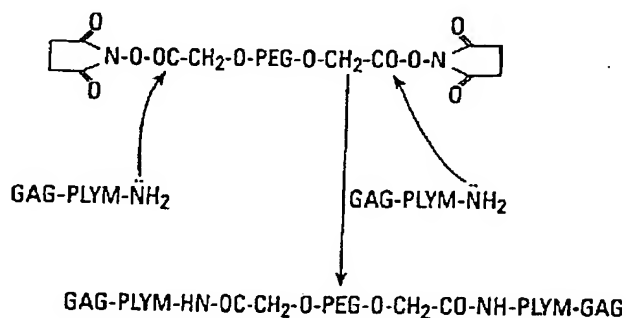
式 3

【0113】式2および3の化合物に類似した本発明の 20*が、注目される。これらの結合は、生理学的条件下で安他の好ましい実施態様は、n=1のときに提供される。 定である。

構造式および得られる結合体を式4に示す。この結合体 【0114】

が、エーテル結合およびペプチド結合の両方を含むこと* 【化14】

S-PEG, n=1: 二官能性活性化PEGスクシンイミジル



式 4

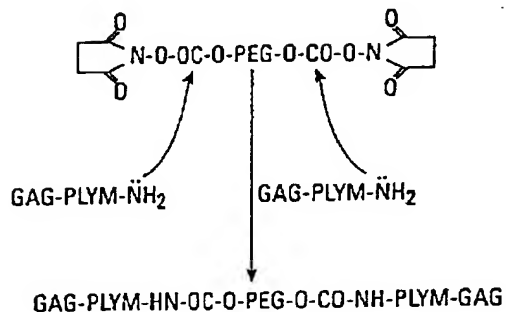
【0115】PEGのさらに他の二官能性活性化形態は、n=0のときに提供される。この化合物は、PEGスクシンイミジルカーボネート(SC-PEG)と称される。この化合物の構造式、およびSC-PEGとグリコサミノグリカン誘導

体とを反応させることにより形成される結合体を式5に示す。

【0116】

【化15】

SC-PEG, $n=0$: 二官能性活性化PEGスクシンイミジルカーボネート



式5

【0117】式1～5に示す全ての誘導体は、スクシンイミジル基の中に含む。しかしながら、異なる反応基が、PEG分子の一端または両端に結合し得る。例えば、PEGは、式6に示す二官能性活性化PEGプロピオンアルデヒド(A-PEG)を形成するために誘導体化され得る。式6

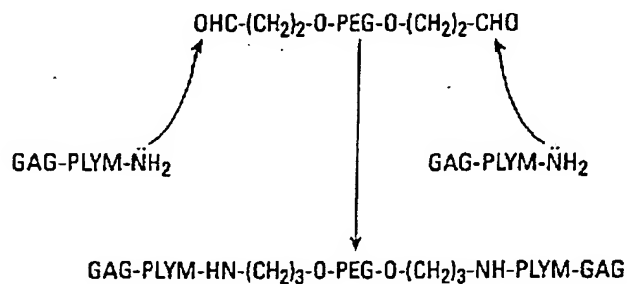
*より形成される結合体を示す。式6に示される結合は、 $-(\text{CH}_2)_n\text{-NH-}$ 結合(ここで、 n は1～10である)と称される。

【0118】

【化16】

には、A-PEGとグリコサミノグリカン誘導体との反応に*

A-PEG: 二官能性活性化PEGプロピオンアルデヒド



式6

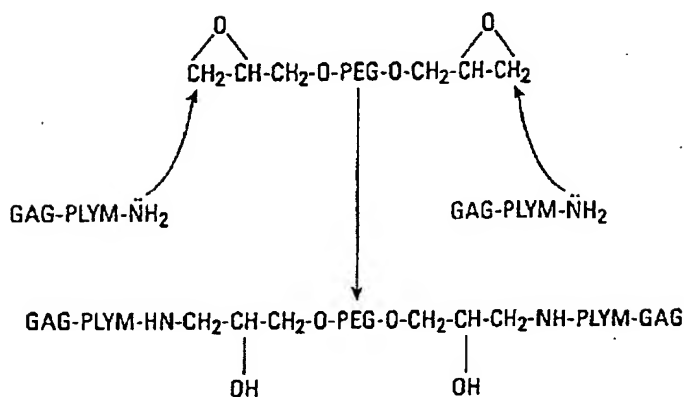
【0119】さらに、PEGの他の二官能性活性化形態は、式7に示すPEGグリシジルエーテル(E-PEG)である。式7には、E-PEGとグリコサミノグリカン誘導体とを反

応させることにより形成される結合体を示す。

【0120】

【化17】

E-PEG: 二官能性活性化PEGグリシジルエーテル



式7

【0121】（グリコサミノグリカンの化学的誘導体化）本発明のグリコサミノグリカン-ポリマー結合体を作るために、グリコサミノグリカンはまず、PEGとの共有結合による架橋のための利用可能なフリーのアミノ（-NH₂）基を与えるように、化学的に誘導体化されなければならない。フリーのアミノ基を与えるためのグリコサミノグリカンの化学的な誘導体化は、脱アセチル化または脱硫酸化のいずれかで達成され得るが、これらはいずれも水酸化ナトリウムのような強塩基をグリコサミノグリ

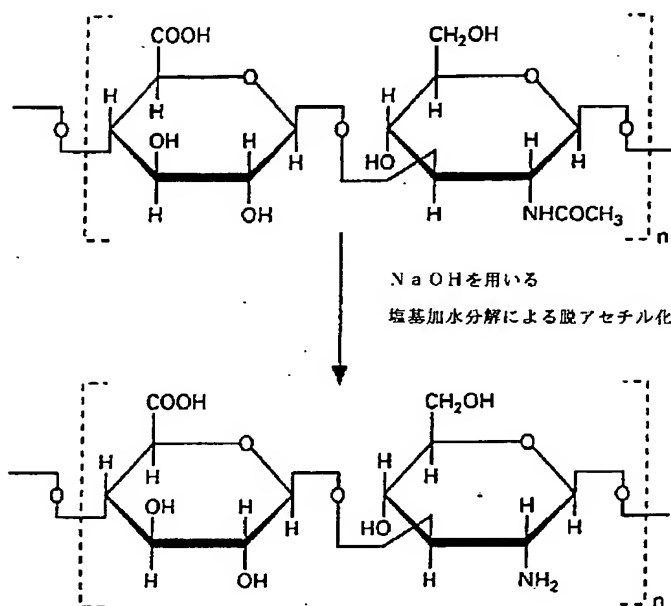
カン溶液に添加することによって行われ得る。

【0122】ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸類、ケラタン硫酸、ケラト硫酸、およびキチンのようなグリコサミノグリカン、ヒアルロン酸およびキチンについてそれぞれ反応スキーム1および2に示されるように、フリーのアミノ基を与えるために脱アセチル化（ $-\text{COCH}_3$ 基の除去）され得る。

【0 1 2 3】

【化18】

NaOHを用いるヒアルロン酸の脱アセチル化



反応スキーム1

【0124】

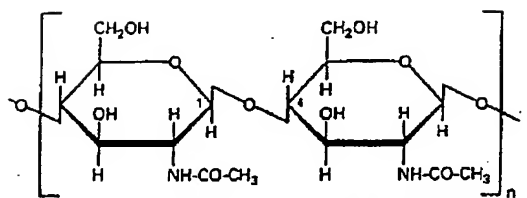
【化19】

(22)

特開平7-278203

41

NaOHを用いるキチンの脱アセチル化



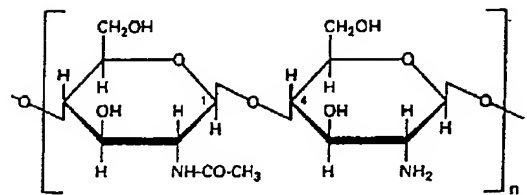
N-アセチルグルコサミン

N-アセチルグルコサミン

NaOHを用いる

塩基加水分解による脱アセチル化

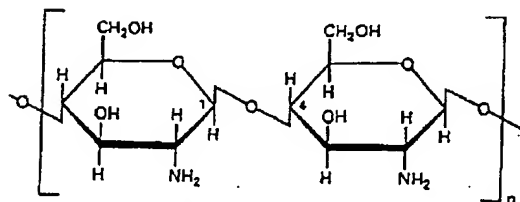
キトサン1



N-アセチルグルコサミン

(部分的に脱アセチル化されたキチン)

キトサン2



(完全に脱アセチル化されたキチン)

反応スキーム2

42

【0125】反応スキーム3に示されるように、ヘパリン、コンドロイチン硫酸類、ケラタン硫酸、およびケラト硫酸のようなグリコサミノグリカンは、フリーのアミノ基を与えるために脱硫酸化(-SO₃基の除去)され得る。

【0126】

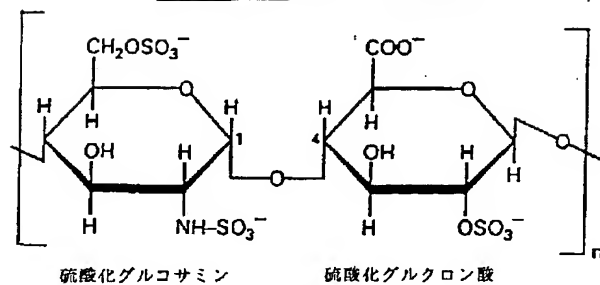
【化20】

10

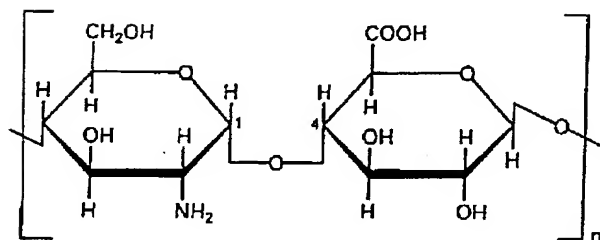
20

30

NaOHを用いたヘパリンの脱硫酸化



NaOHを用いた
塩基加水分解による脱硫酸化



反応スキーム 3

【0127】以下の表1のとおり、コンドロチン硫酸類、ケラタン硫酸、およびケラト硫酸のような、特定のグリコサミノグリカンは、 $-\text{COCH}_3$ 基および $-\text{SO}_3$ 基の両方を含んでいる。そのために水酸化ナトリウムを添加することによって脱アセチル化および脱硫酸化の両方がなさ

れる。コンドロイチン硫酸Cの脱アセチル化および脱硫酸化を反応スキーム4に示す。

【0128】

【表1】

化合物	脱アセチル化	脱硫酸化
キチン	可	不可
コンドロイチン硫酸 A	可	可
コンドロイチン硫酸 B	可	可
コンドロイチン硫酸 C	可	可
ヘパリン	不可	可
ヒアルロン酸	可	不可
ケラチン硫酸	可	可
ケラト硫酸	可	可

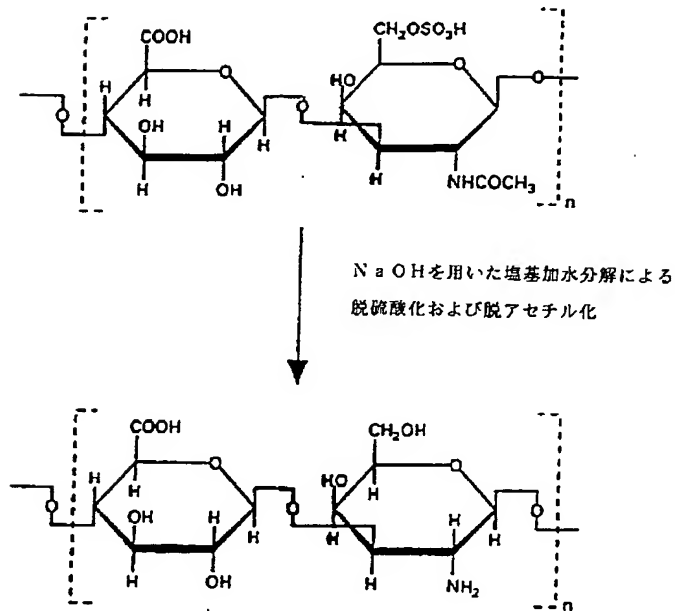
【0129】（化学的に誘導体化したグリコサミノグリカンとPEGとの架橋）フリーのアミノ基を有するように、化学的に誘導体化されたグリコサミノグリカンは、脱アセチル化されたヒアルロン酸については反応スケー

ム 5 に示すように、活性化された多官能性PEGと架橋され得る。

【0130】

【化21】

コンドロイチン硫酸Cの脱アセチル化および脱硫酸化



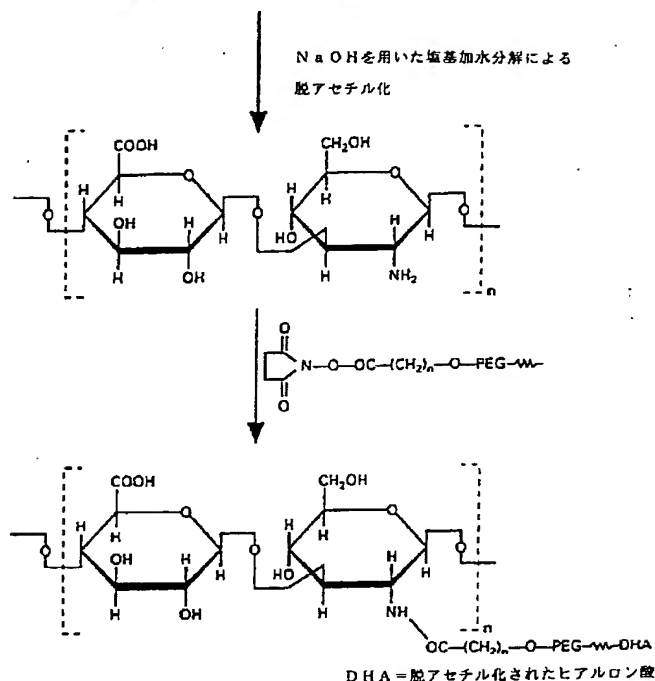
反応スキーム4

【0131】

【化22】

脱アセチル化されたヒアルロン酸と

二官能性活性化S-PEGとの架橋



反応スキーム5

【0132】グリコサミノグリカン-ポリマー結合体は、化学的に誘導体化されたグリコサミノグリカンと官能性活性化ポリマーとを合わせる時間(分)内に形成される。グリコサミノグリカン誘導体は、シリンジーシリンジ(syringe-to-syringe)混合を用いてポリマーと混合され得る。あるいは、グリコサミノグリカン誘導体を活性化したポリマー溶液の中に押出すことも可能であり、ポリマーがグリコサミノグリカンに拡散するにつれて架橋が起こる。

【0133】結合体形成速度および得られる結合体の特徴は、用いられる活性化PEGのタイプおよび/またはPEGの分子量および濃度を変えることによって変化し得る。一般に、エーテル結合またはウレタン結合を生じるPEG種(例えば、S-PEG)の使用によって、容易に加水分解されるエステル結合を生じるPEG種よりも、安定化された結合体が生成される。しかし、薬物送達への適用のような特定の状況では、より弱いエステル結合を含むこと

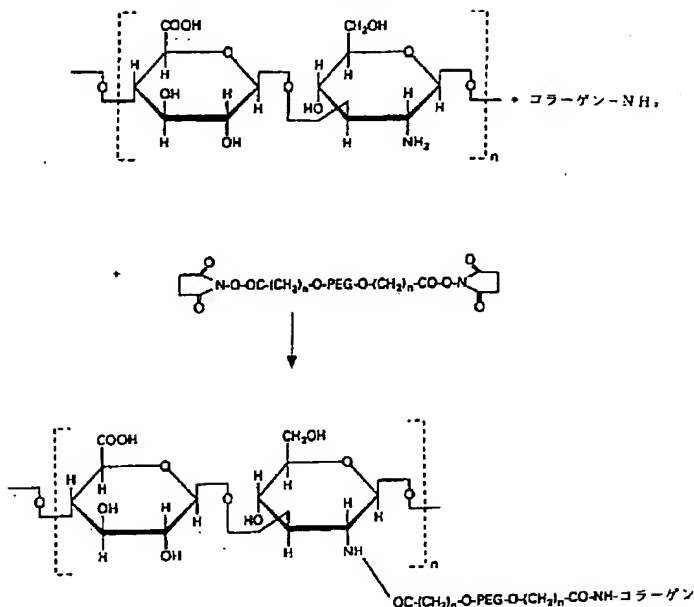
が望ましい。この結合は、生理学的条件下での加水分解によって徐々に切断され、マトリックスから離れ、そしてその中に保持された薬学的に活性な成分を放出する。同一の薬物送達組成物において、異なる種のPEGが混合されて使用され得、その結果、この組成物は種々のマトリックス分解速度、および、それ故に種々の薬物放出速度を有する。

【0134】多官能性活性化PEGは、脱アセチル化されたヒアルロン酸およびコラーゲンについては反応スキーム6に示すように、1種より多いグリコサミノグリカン誘導体同士、または、グリコサミノグリカン誘導体とコラーゲンを架橋するために使用され得る。得られる組成物材料は、PEGと架橋したコラーゲン単体またはPEGと架橋したグリコサミノグリカン単体のいずれとも異なる物理的特性および化学的特性を有する。

【0135】

【化23】

コラーゲンおよびヒアルロン酸と
二官能性活性化S-PEGとの架橋



反応スキーム 6

【0136】グリコサミノグリカン-ポリマー-コラーゲン組成物は、実施例3～6に示すように、多くの方法で製造し得る。

【0137】本発明で使用するための適切なコラーゲンには、あらゆるタイプのコラーゲンが含まれる。しかし、タイプI、II、およびIIIが好ましい。本発明の実施に用いたコラーゲンは、繊維状（例えば、Zyderm（登録商標）Collagen）または非繊維状のいずれかであり得る。結合体の所望の最終用途に依存して、テロペプチドまたはアテロペプチドのいずれかを含有するコラーゲンが使用され得る。種々の形態のコラーゲンが商業的に入手可能であるか、または、例えば米国特許第3,949,073号；同第4,488,911号；同第4,424,208号；同第4,582,640号；同第4,642,117号；同第4,557,764号；および同第4,689,399号（すべて本明細書中で参考として援用する）に記載の工程によって調製され得る。コラーゲンは、コラーゲンをグリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体に結合させるために用いられ得る、多数の利用可能なアミノ基またはヒドロキシ基を含む。コラーゲンをポリエチレングリコールに結合させる方法は、米国特許第5,162,430号に詳細に記載されている。

【0138】（用途と投与）本発明のグリコサミノグリカン-合成ポリマーおよびグリコサミノグリカン-合成ポリマー-コラーゲン結合体の第一の用途は、軟組織の増強（例えば、皮膚の増強または括約筋の増強）および薬物送達のための注入可能な組成物としての用途である。注入可能な処方物として、約10から約100mg/mLまで

の範囲内の濃度のグリコサミノグリカンが一般に使用される。組成物中の活性化合成ポリマーの濃度は、好ましくは、組成物1ミリリットルあたり活性化合成ポリマー約1ミリグラムから約400ミリグラムまでの範囲内である。

【0139】グリコサミノグリカンと合成ポリマーとの間の架橋はインビトロで行われ得、または、反応混合物はインサイチュでの架橋のために注入され得る。グリコサミノグリカン誘導体および活性化ポリマーは、容器2個付きのシリンジ(double-barreled syringe)の別々の容器に保存され得る。シリンジのプランジャーを押し下げ、そして物質を皮下に注入するとき、成分をシリンジの針の中で混合し、そしてインサイチュで架橋させる。いくつかの活性化ポリマー分子は被験体自身のコラーゲンにさらに架橋して、移植片を適切な位置につなぎとめ得る。ゲルは、投与後20分またはそれ未満の時間内に形成される。注入可能な組成物は、さらに、外科的手術が望ましくなかったり、または推奨されない場合の硬組織の修復に使用され得る。硬組織への適用では、注入可能な組成物は、設置位置で骨または軟骨の再生のためのマトリックスとして役立つ。

【0140】注入可能な水溶液に加えて、予備重合したグリコサミノグリカン-ポリマー結合体は、乾燥され、そして乾燥粒子に粉砕され得る。あるいは、グリコサミノグリカン-ポリマー結合体は、ビーズあるいはドロップ状(droplet)の形態に乾燥され得る。結合体を含有する、これらのビーズまたは粒子は、非水性キャリア中に

懸濁され、そして増強の必要な軟組織に注入され得る。インサイチュにおいては、粒子は再び水和し、そしてポリエチレングリコール分子の親水性によって、3倍から5倍に膨張する。従って、所望の接続を達成するために必要な製造物の体積はより少ない。

【0141】多官能性活性化合成ポリマーは、グリコサミノグリカン誘導体を、コラーゲン、または、生物学的に活性なタンパク質（例えば、サイトカインおよび増殖因子）に共有結合により架橋させ得る。そのような組成物は、特に、創傷の治癒、骨形成、および免疫調節の際の使用に適する。生物学的に活性な分子をグリコサミノグリカンにつなぎとめることにより、有効な持続放出薬物送達系を提供する。上記のように、薬物放出速度を変化させるように、異なる種のポリエチレングリコールが処方物中に含有され得る。

【0142】生物学的に活性なサイトカインまたはTGF- β のような増殖因子を含有する本発明の組成物は、適切な量のサイトカインまたは増殖因子を組成物中に混合すること、または、活性化PEGとの反応に先立って、サイトカインまたは増殖因子をグリコサミノグリカンに組み込むことによって調製され得る。好ましくは、サイトカインまたは増殖因子を、まず、希釈溶液中でモル過剰の多官能性活性化ポリエチレングリコールと3から4分間反応させる。活性化ポリマーを、好ましくは30から50倍モル過剰になる最終濃度まで加える間に、サイトカインまたは増殖因子を、好ましくは約1 μ g/mLから約5 mg/mLの濃度で与える。次に、結合した生物学的に活性な因子-合成ポリマーを、中性のpH（およそpH7~8）で、グリコサミノグリカン混合物水溶液（好ましくは約1から約60 mg/mLまでの範囲内の濃度を有する）に加え、そしてさらに反応させて生物学的に活性な因子-合成ポリマー-グリコサミノグリカン結合体を形成させる。得られる組成物を、室温で1晩放置する。ベレットを遠心分離によって集め、そして激しい渦流を使ってPBSで洗浄して、非結合因子を除去する。

【0143】サイトカインまたは増殖因子のような生物学的に活性な因子を含有する本発明の組成物は、特に創傷の治癒促進のような場合のように、因子の持続的な放出に適している。骨形成誘導因子および補助因子（TGF- β を包含する）および骨形態発生タンパク質（BMP）は、骨の置換、増強、および/または欠損修復のための組成物に有利に取り込まれ得る。あるいは、TNF、インターフェロン類、CSF類、TGF- β などのような抗ウィルスおよび抗腫瘍因子も、それらの薬学的活性のために投与し得る。組成物に取り込むサイトカインまたは増殖因子の量は、使用する因子のタイプ、処置する状態の程度、所望の送達速度などによって決定される。これらのパラメータは、日常的な実験で（例えば、上記の結合した因子-ポリマー-グリコサミノグリカン組成物を調製し、そして適切な動物モデルで因子の放出速度をアッセ

イすることにより）、決定され得る。

【0144】グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体の組成物はまた、比較的固い移植片にも形成され得る。本発明の組成物は、十分稠密かつ剛直で、軟骨の代用になる形態で調製され得る。これらの組成物は、ある程度の構造と剛直さを必要とする組織を修復し、そして支持するために（例えば、鼻、耳、膝、喉頭、気管リング(tracheal ring)、および関節表面の再構築において）、有用である。また、適切に形成された軟骨様材料を用いて、腱、靱帯、および血管を置換し得る。これらの適用では、材料は、一般に所望の形状にキャストまたは成形される。腱および靱帯の置換のための材料は、グリコサミノグリカン-ポリマー結合体の単繊維を編むまたは織ることによって、コードまたはロープにされ得る。人工血管の場合は、強化メッシュ（例えば、ナイロン、Teflon（登録商標）、またはDacron（登録商標））を取り込むことが有利であり得る。

【0145】骨欠損または不接合(nonunion)の修復に適切な処方物は、グリコサミノグリカン-合成ポリマー；グリコサミノグリカン-合成ポリマー-コラーゲン；またはサイトカインまたは増殖因子と組み合わせたこれらの結合体のひとつ（これらはいずれも適切な粒子状材料と混合して使用され得る）のような、生体適合性の結合体の高濃度組成物を与えることによって調製され得る。インビボで長時間持続するように意図された骨の修復組成物を作成するときには、グリコサミノグリカンと合成ポリマーとの間の結合は、エステル結合の加水分解による劣化を避けるため、エーテル結合であり得る。このような結合体/粒子状組成物は、取り込まれた液体の量に依存して、順応性または剛直であり得る。応力に耐える骨の治療のための処方物は、好ましくは乾燥され、そして剛直であり、そして一般に約45%と約85%との間の粒子状の無機質（例えば、ヒドロキシアパタイトまたはリン酸三石灰、あるいは、これらの混合物）を含有する。引張強度および剛直さは、この組成物を真空で約60~90℃、好ましくは約75℃で、約5から15時間、好ましくは約10時間、加熱することによって、さらに増大され得る。

【0146】柔軟なシート状または膜状の形態のグリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体は、当該分野で公知の方法（例えば、米国特許第4,600,533号、同第4,412,947号、同第4,242,291号）によって調製され得る。簡単には、およそ10~100 mg/mLの範囲の濃度を有するグリコサミノグリカンの水溶液を、平らな容器の底部にキャストする。活性化したポリエチレングリコールの溶液をグリコサミノグリカン溶液に加え、そして室温で、数時間から一晩までの間、反応させる。得られたグリコサミノグリカン-ポリマー結合体をスパチュラを用いて容器の底部から取り出し、PBSで洗浄して過剰の未反応ポリマーを除去する。

【0147】得られる結合体組成物に一定圧をかけて圧縮して、均一なシートまたはマットを形成し、そして任意に真空オープン下で、あるいは、凍結乾燥または空気乾燥で、脱水することにより、本発明の膜が得られ得る。より柔軟な膜は、より低い濃度のグリコサミノグリカン、さらに高い濃度の合成ポリマー、およびより短い反応時間を用いることによって得られ得る。

【0148】グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体はまた、結合後の組成物のスラリー水溶液を凍結乾燥することによってスポンジの形態に調製され得る。

【0149】グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体組成物は、約5から約95%の範囲の水分含量を有するヒドロゲル中に処方され得る。水分含量を変化させることによって、所望の最終用途に依存して、種々の密度および剛性のヒドロゲルが得られ得る。

【0150】グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体は、胸部移植片をコートするために使用され得る。標準的なシリコンのシェル状移植片の表面は、化学的に誘導体化され得、二官能性または多官能性活性化PEG-グリコサミノグリカン（グリコサミノグリカン-PEG-シリコン）のための活性な結合位置を与える。活性化PEGを介してシリコンに直接結合した結合体コーティングの存在によって、癒着組織の形成および被膜の癒着（capsular contracture）を減少させる。典型的なコートされた移植片とは違って、癒着組織はコーティングと移植片との間では成長できない。なぜなら、コーティングが移植片の表面に直接結合しているからである。

【0151】あるいは、グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体処方物の柔軟なシートは、胸部移植片シェルとして使用するための中空スフェアに形成され得る。このシェルを、次いでマンモグラフィを容易にするためにトリグリセリドのような放射線不透過物質で充填し得る。

【0152】グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体の処方物はまた、カテーテル、カニューレ、骨プロテーゼ、軟骨置換体、ミニポンプおよび他の薬物送達デバイス、人工器官および人工血管、組織強化のためのメッシュなどのような、体内で長期間使用する、他のタイプの移植片をコートするために使用され得る。グリコサミノグリカン-合成ポリマー組成物はまた、白金ワイヤをコートするために使用され得、このことによってこの組成物はカテーテルを介して動脈瘤の位置に投与され得る。このような表面処理は、移植片を免疫原性にし、そして生体拒否反応（foreign body reaction）の発生を減少させる。

【0153】結合体組成物を有する移植片のコーティングは、架橋が起こっている間にグリコサミノグリカンおよび合成ポリマーを含む溶液中に移植片を浸漬し、そして架橋を完了させながら付着性の粘性のコーティングを乾燥させることによって達成され得る。浸漬が不可能な

場合は、移植片に反応混合物を浴びせるか、刷毛で塗るか、または塗布し得る。あるいは、柔軟なシート状または膜状の形態の結合体を物体に巻き付け、隅部および端部を反応混合物を用いて密封し得る。

【0154】

【実施例】結合体および処方物およびそのような結合体を含有する移植片の作成方法の完全な開示および説明を当業者に提供するために、以下の実施例を示す。これらの実施例は本発明の範囲の限定を意図していない。使用される数値（例えば、量、温度、分子量）に関して正確にする試みがなされているが、実験誤差および偏差が含まれ得る。他に示されていないならば、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏であり、そして圧力は大気圧または近似大気圧である。

【0155】（実施例1）1グラムのヒアルロン酸ナトリウム（Life Core Biomedicalから入手される）を15mlの0.2M NaOHに加え、そして一晩溶解させて均一な溶液にする。1MのHCl溶液で中性にしたヒアルロン酸5mlを、シリンジーシリンジ混合を用いて、0.5mlのPBS溶液中で二官能性活性化したS-PEG 50mgと混合した。

【0156】得られた材料をシリンジからベトリ皿に押し出し、そして37℃でインキュベートした。16時間後、この材料を架橋したゲルにした。

【0157】S-PEGを含有しないヒアルロン酸を、この実験のコントロールとして用いた。16時間インキュベート後、このコントロールはまだ流体で流動的であった。

【0158】（実施例2）二官能性活性化S-PEG40mgを145μlの1M HClと混合した。完全に混合した後、酸性化したS-PEG溶液をシリンジに吸い取った。

【0159】脱アセチル化したヒアルロン酸の6.6%(w/v)溶液を、ヒアルロン酸を0.2MのNaOHと混合することによって調製した。脱アセチル化したヒアルロン酸溶液（pH13）も、シリンジに移した。

【0160】次に、2本のシリンジを三方コック栓に接続し、そしてシリンジーシリンジ混合を用いて内容物を混合した。酸性化したS-PEGを脱アセチル化したヒアルロン酸と混合することによって、溶液のpHを中性にし、そして架橋反応を起こさせた。

【0161】60〜70回転かして混合した後、材料を1本のシリンジに移した。コック栓および第2の（空の）シリンジを取り外した。材料は、この時点で注入およびインサイチュでの架橋が可能な状態になった。

【0162】（実施例3）35mg/mlのコラーゲン溶液（pH2）1mlを、二官能性活性化S-PEGの酸性化した溶液（2%(w/v)）1mlと混合する。このS-PEG-コラーゲン溶液を、直ちに脱アセチル化したヒアルロン酸の10mg/ml溶液（pH13）2mlと混合し、混合物のpHを中性にし、そして二官能性活性化S-PEGをコラーゲンおよびヒアルロン酸の両方と共有結合によって結合させ

る。

【0163】（実施例4）Zyderm（登録商標）I Collagen（35mg/ml）1ミリリットルおよびヒアルロン酸の10mg/ml溶液1mlをpH10で混合する。次いで、このコラーゲン-ヒアルロン酸溶液を、二官能性活性化S-PEGを2%（w/v）含有する0.1M HCl（pH1）溶液2mlと混合してこの溶液を中性にし、そしてPEGと、コラーゲンと、ヒアルロン酸との間で架橋させる。

【0164】（実施例5）35mg/mlのZyderm（登録商標）I Collagen（pH7）1ミリリットルを脱アセチル化したヒアルロン酸を10mg/ml含有する0.2M NaOH（pH13）溶液1mlと混合する。酸性化した二官能性活性化S-PEGの4%（w/v）溶液2ミリリットルを、直ちに加えてpHを中性にし、そしてこれら3成分の間の架橋を行う。

【0165】（実施例6）Zyderm（登録商標）I Collagen 1ミリリットルおよび脱アセチル化したヒアルロン酸の10mg/ml溶液1mlを、それぞれpH9に調整し、次いで一緒に混合する。次に、0.1M HClを加えることによってこのコラーゲン-ヒアルロン酸溶液のpHをおよそ7に調整して、ヒアルロン酸およびコラーゲンに、イオン性相互作用による弱いゲルを生成させる。続いて二官能性活性化S-PEGを加えて、共有結合による架橋をし、強いゲルにする。

【0166】（実施例7）

（移植片のコーティング）実施例1に記載のヒアルロン酸-S-PEG反応混合物を調製する。架橋開始後直ちに、チタン製移植片をこの反応混合物に浸漬する。移植片コーティングの架橋を完了させ、そして1晩乾燥させる。

【0167】本発明は、最も実用的で、そして好ましい実施態様と考えられることに対して本明細書中で示され、そして記載されている。しかし、本発明からの逸脱は、本発明の範囲内で行われ得、明らかな変更は、この開示内容を読むことにより当業者により行われ得ることが理解される。

【0168】

【発明の効果】本発明によれば、グリコサミノグリカンまたはそれらの誘導体と親水性合成ポリマーとを、生体適合性の結合体を提供する特定のタイプの化学結合を介して共有結合させることにより、薬学的に受容可能で非免疫原性の組成物が形成される。この有用なグリコサミノグリカンとしては、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫

酸類、ケラタン硫酸、キチン、キトサン類、およびヘパリンが挙げられ、これらはそれぞれ、親水性合成ポリマーと反応して化学的に誘導体化される。親水性合成ポリマーと共有結合しているグリコサミノグリカンを含む結合体は、コラーゲンとさらに結合して、異なる特性を有する三成分結合体を形成し得る。親水性合成ポリマーは、約100～約100,000の範囲にわたる平均分子量を有するポリエチレングリコールおよびその誘導体であり得る。組成物は、他の成分（例えば、注入可能な処方物を形成するための薬学的に受容可能な流動性キャリア）および/または生物学的に活性なタンパク質（例えば、増殖因子またはサイトカイン）を含有し得る。本発明の結合体は、一般に、形成時に多量の水を含む。結合体は、硬組織増強において使用する相対的に堅い移植片を形成するために脱水され得る。脱水した堅い移植片は、さらに、粒子に粉砕され得、これは、非水性流体中に懸濁され、そして軟組織増強のために生体（好ましくは、ヒト）へ注入され得る。堅い移植片または粒子は、所定の場所に注入されると、水を再吸収し、そして約3～5倍の大きさに膨張する。

【0169】本発明のグリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体は、従来のグリコサミノグリカン組成物と比較して、インビボでのより高度な安定性を有し、かつ、優れた取り扱い特性を有する。

【0170】本発明のグリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体を含有する組成物は、従来のコラーゲン組成物と比較して、免疫反応を低下させ得、そして、改良された成形性、順応性、および弾性を有する。

【0171】本発明においては、生理学的条件下で、例えば、サイトカインまたは増殖因子の活性および利用可能な半減期を改良するために、組成物および結合体を、薬学的に活性なタンパク質（例えば、サイトカインまたは増殖因子）と組み合わせて処方する能力を有する。

【0172】本発明の共有結合したグリコサミノグリカン-合成ポリマー-コラーゲンを含有する三部分結合体は、グリコサミノグリカン-合成ポリマー結合体またはコラーゲン-合成ポリマー結合体のいずれか一方だけとは異なる物理的および化学的特性（この特性は、組成物中のグリコサミノグリカンおよびコラーゲンの相対的比率を変化させることにより、所望のように操作され得る）を有する。

フロントページの続き

(72)発明者 リチャード エイ. バーグ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94024,
ロス アルトス, サウス スプリング
ロード 660